



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE**

PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA EN LOS PROCESOS COGNITIVOS QUE DEPENDEN DEL HIPOCAMPO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

**PRESENTADA POR
Irene Suárez Pereira bajo la dirección del
Doctor Ángel M. Carrión Rodríguez
Sevilla, 2015**



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide.
Presentada por **IRENE SUÁREZ PEREIRA**. Realizada en la Universidad Pablo de Olavide, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, División de Neurociencias; bajo la dirección del Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez.

Vº.Bº del Director de la Tesis
Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez

La doctoranda,
Irene Suárez Pereira



Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez,
Facultad de Ciencias Experimentales,
Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular.
Universidad Pablo de Olavide.

HACE CONSTAR: Que Doña **IRENE SUÁREZ PEREIRA**, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, de la Universidad Pablo de Olavide, el trabajo de su Tesis Doctoral: **“Papel de la neurogénesis hipocampal adulta en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo”**, y considera que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de doctor.

Revisada la memoria del trabajo, queda conforme con su presentación.

En Sevilla, a 7 de Septiembre de 2015
Fdo. Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez

A todos los que soñaron este sueño conmigo.

***...de formas delicadas y elegantes,
las misteriosas mariposas del alma...(las neuronas)
Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)***



AGRADECIMIENTOS

La presente tesis no es solo producto del esfuerzo de una aspirante a grado de doctor. Por ello, aunque sea persona de pocas palabras, no pueden faltar unas líneas de agradecimiento a todos aquellos que con su apoyo, comprensión y cariño me han estado motivando y han colaborado para poder llegar a alcanzar esta meta. Muchos años han pasado ya... y eso conlleva mucho que agradecer, así que espero no dejarme a nadie.

A pesar del largo camino recorrido, aún me parece que fue ayer cuando por primera vez la Universidad Pablo de Olavide me abrió sus puertas para unas charlas de orientación. Gracias por darme a conocer nuevos horizontes, por hacer mella en mí de tal modo que rompí con mis ideas infantiles de “qué quería ser de mayor” para embarcarme en una gran aventura hacia lo desconocido, hacia Bio...qué? BIOTECNOLOGÍA. Gracias también por despertar en mí el gusanillo de la ciencia y acogerme durante toda mi formación. Son muchas las personas que me ha dado conocer esta Universidad: profesores, compañeros de carrera, compañeros de máster, ... a los que debo agradecer no solo los conocimientos transmitidos y compañerismo; si no también los momentos inolvidables de toda vida universitaria que siempre quedarán en mi memoria, así como grandes amistades.

La primera mención especial es a mi Director de Tesis, Ángel Carrión. Gracias Ángel por darme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación y apostar por mí siendo sólo una alumna de primeros años de carrera. No puedo estar más agradecida por todo lo que he aprendido aquí contigo. De lo que más valoro es la libertad que siempre me has brindado para hacer ciencia, permitiéndome hacer desde experimentos de los que a lo mejor... no dabas un duro, hasta la presente tesis, de la cual puedo sentirme muy orgullosa, al decidir juntos que pasos seguir partiendo de cero. Todo ha sido posible gracias a tu cercanía, tu disponibilidad y por la enorme confianza que depositaste en mí desde el primer día, e incluso en las ocasiones en qué ni yo lo haría de mi misma. Gracias por hacer que me apasione mi trabajo por tus brillantes ideas y discusiones científicas, tienes mi más profunda admiración. Más allá del trabajo de laboratorio, gracias por todos los momentos vividos, de las risas y hasta de los enfados, porque no sólo has sido un director de tesis o un jefe, si no una persona con la que contar y darme tu apoyo. Gracias por todo, Ángel.

En estos años en el laboratorio, son muchos los que han ido llegando y marchándose, pero todos han colaborado a convertir el laboratorio en un lugar en el que compartir ciencia y amistad. En mi corazón guardo un recuerdo

entrañable de la gente presente en mis comienzos: Ángela, Rocío Romero y Mónica, por ayudarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio y enseñarme mucho de lo que sé. Un “gracias” muy especial es para Ángela Fontán. Gracias por tu paciencia, por permitirme ayudar en tu trabajo y por apoyarme en todo lo que ha estado en tu mano. Sobre todo, gracias por ser mi mentora a la hora de trabajar con ratones, esta tesis no habría sido posible sin tus enseñanzas.

No puedo dejarme atrás a los alumnos que empezaron conmigo: Juanma, Yai y Cristina. Juntos nos iniciamos en el cacharreo de laboratorio compartiendo nuestros errores de principiantes, los cuales nos hicieron crecer; además de por supuesto, darnos múltiples anécdotas y risas. En especial, gracias Cristina por ser mi “Pon”, mi compañera y mi amiga. Jamás podré olvidar los momentos de laboratorio compartidos contigo en nuestras batallas científicas de “Pin y Pon”.

También quiero mencionar a las siguientes generaciones (“las Elenas”, Paco, Taty, “la Nutri”, Almudena, Alejandro, Marta...) por permitirme transmitir lo que me enseñaron a mí en su día, por su entusiasmo por aprender y ayudar y por aportar nuevos puntos de vista y buenos momentos. En especial, quiero agradecer a Taty su apoyo técnico durante gran parte del desarrollo de la tesis para que nuestro laboratorio funcione en el día a día.

En estas líneas de agradecimiento deben ocupar un lugar de honor, Rocío Ruíz y Sara Bachiller, a veces compañeras, a veces madres, a veces hermanas, pero siempre amigas. A Ro, gracias por la oportunidad de haberte conocido. Eres una científica increíble, un modelo a seguir. Gracias por contribuir, opinar, criticar y dar ideas. A mi chica del norte, Sarita, gracias por ser única. No tengo palabras para expresar mi agradecimiento por tu ayuda y apoyo en la finalización de mi tesis. Gracias por estar siempre a mi lado, animándome y haciéndome reír. Sobre todas las cosas, gracias a las dos por vuestra amistad, por vuestros consejos y apoyo incondicional. Por demostrar estar conmigo en los buenos y malos momentos. Gracias por marcar un antes y un después con vuestra llegada, no sólo en el laboratorio, sino también en mi vida.

Mi gratitud no sólo se limita al laboratorio, el sentimiento es extensivo al resto de profesores, técnicos, becarios y personal del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular. En especial, a la División de Neurociencias (José María, Agnès, Armengol, Eva, Yuniesky, Marian, Pier, María, Jose, Ana,...). Tanto por las sonrisas y conversaciones, científicas y no científicas, por los pasillos, como por su colaboración y saber hacer.

He de destacar que esta tesis no podría haberse llevado a cabo sin la colaboración del personal del servicio de irradiación del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD). Gracias por facilitar la realización de los experimentos. Igualmente debo agradecer al Dr. Santiago Canals por acogerme en su laboratorio para complementar mis resultados y formarme en

el campo de la electrofisiología in vivo. Gracias a él y al resto de miembros de su laboratorio (Andrea, Bego, Efrén,...), por su tiempo y paciencia, por tratarme como a una más y hacer agradables los meses que compartí con ellos en Alicante.

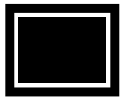
Los últimos agradecimientos, aunque no menos importantes, son para mi familia y amigos.

A mis padres por su amor, trabajo y sacrificios en todos estos años. Por ser para mí una fuente de motivación día a día e inculcarme que ponga altas mis metas, aunque en ocasiones supusiera restarle horas a su compañía o soportar a este “bichillo testarudo de alma libre”. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en quién soy. Gracias por estar ahí pase lo que pase.

A mis amigos cercanos y lejanos, a los nuevos y a los viejos, a los perdidos y a los que permanecen a mi lado... (Ro Caro, Ali, Ale y el pequeño Iván; María y Josemari, mis pileños, Maca, Jony, al grupo master...todos!!!). Por su amistad. Por hacerme crecer como persona y compartir momentos inolvidables. Por su paciencia y consolarme en los momentos bajos, algunos incluso sin entender demasiado bien en qué consistía mi trabajo o sin apenas conocerme. Y por soportar el estrés y el mal humor que han acompañado en algunos momentos la escritura de esta tesis. Gracias por darme aliento y apoyarme para seguir adelante.

En especial, a mi Tamara, mi increíble compañera de aventuras. Gracias por ser como eres, estar siempre al pendiente y animarme. Y como no, a mi mejor amigo, mi Juanito. Gracias por estar siempre ahí.

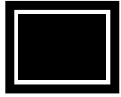
A todos y cada uno de vosotros, un millón de gracias!!! ☺



RESUMEN

En las últimas dos décadas se ha estudiado intensamente el proceso de neurogénesis, con especial interés la neurogénesis adulta. Aunque se ha descubierto cómo se desarrollan y maduran las nuevas neuronas adultas del hipocampo desde el punto de vista morfológico y electrofisiológico, el papel de la neurogénesis hipocampal adulta (NHA) es controvertido debido a que los protocolos que provocan una disminución prolongada de la NHA si bien afectan a los procesos de aprendizaje y memoria, también ocasionan importantes efectos colaterales.

El objetivo de este trabajo es determinar el papel de la NHA en las distintas fases de los procesos de aprendizaje y memoria que dependen del hipocampo. Para ello, hemos diseñado un nuevo protocolo de irradiación con rayos X en el animal despierto e inmovilizado que elimina más del 90% de los precursores neuronales en un periodo comprendido entre 6 y 72h después de la irradiación, sin afectar al funcionamiento de las neuronas adultas ni generar respuesta neuroinflamatoria. Además, este protocolo permite la realización de experimentos de conducta tan solo 4 horas después de la irradiación. Aplicando este protocolo de ablación a distintos momentos con respecto a una sesión de entrenamiento para la formación de memoria de reconocimiento de objetos y de evitación pasiva, hemos descubierto que la NHA se requiere para adquisición y la formación de memoria duradera de nueva información. En base a registros multicanal del hipocampo en el animal anestesiado, se comprobó que la eliminación de la NHA impide la potenciación sináptica duradera de los circuitos hipocampales inducida por estimulación de alta frecuencia de la vía perforante, el correlato celular de los procesos de aprendizaje y memoria. Por otro lado, hemos determinado el papel de la NHA sobre la modificación de memorias de reconocimiento de objetos ya almacenadas. En este sentido, hemos descubierto que la NHA es requerida para la actualización de memorias ya almacenadas y no para reforzar dichas memorias. Por último, el inmunomarcaje de genes tempranos, trazadores de cambio de actividad, junto con marcadores de neuronas inmaduras en hipocampos de animales sacrificados 1,5h después de sesiones de entrenamiento y reactivación con distintas combinaciones de objetos, muestran un reclutamiento diferencial de las neuronas maduras e inmaduras cuando los ratones adultos fueron expuestos a ambientes familiares que contienen parámetros novedosos. Todos estos datos indican que la NHA solo se requiere cuando se adquiere información novedosa, bien en forma de nuevo aprendizaje o bien modificando una información ya almacenada. Por todo ello, estos resultados revelan nuevas e interesantes implicaciones de la NHA en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo, lo cual podría ser útil en el estudio de soluciones terapéuticas para enfermedades con trastornos cognitivos.



Abreviaturas frecuentes

DCX: doblecortina

ENT: entrenamiento

EP: evitación pasiva

fEPSP: potencial postsináptico excitatorio de campo [field excitatory postsynaptic potential]

GD: giro dentado

ID: índice de discriminación de objetos

LTM: memoria duradera [*long-term memory*]

LTP: potenciación sináptica duradera [*long-term potentiation*]

PP: vía perforante [*perforant pathway*]

PR-LTM: memoria duradera tras una sesión de reactivación [postreactivation long-term memory]

PS: espiga poblacional [*population spike*]

RA: reactivación

RO: reconocimiento de objetos

SGZ: zona subgranular [*subgranular zone*]

STM: memoria poco duradera [*short-term memory*]

SVZ: zona subventricular [*subventricular zone*]



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. NEUROGÉNESIS ADULTA	3
1.1.1. Antecedentes: Visión histórica de la neurogénesis adulta.	3
1.1.2. Proceso de neurogénesis en el cerebro adulto.	4
1.1.3. Neurogénesis hipocampal adulta.	7
1.1.3.1. Anatomía del hipocampo.	
1.1.3.2. Eventos del proceso de neurogénesis hipocampal adulta.	
1.1.3.3. Etapas/fases del proceso de neurogénesis hipocampal adulta.	
1.1.3.4. Maduración morfológica de las nuevas neuronas. Estadios neurogénicos.	
1.1.3.5. Integración de las nuevas neuronas en el circuito hipocampal.	
1.1.4. Estrategias de estudio del proceso de generación de nuevas neuronas.	15
1.1.4.1. Análisis de células proliferativas.	
1.1.4.2. Expresión de marcadores específicos de intermediarios neurogénicos.	
1.1.4.3. Seguimiento/visualización del proceso de neurogénesis.	
1.1.4.4. Métodos para reducir o incrementar la neurogénesis.	
1.1.5. Factores que regulan la neurogénesis en el cerebro adulto.	21
1.1.6. Perspectiva de la contribución de la neurogénesis hipocampal adulta a los circuitos cerebrales y procesos cognitivos.	26
1.2. BASES CELULARES Y MOLECULARES DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA	29
1.2.1. Conceptos de aprendizaje y memoria. Fases del procesamiento de la información.	29
1.2.2. Paradigmas cognitivos que dependen del hipocampo.	33
1.2.3. Plasticidad neuronal.	36

- 1.2.3.1. Circuito sináptico del hipocampo.
- 1.2.3.2. Eficiencia sináptica.
- 1.2.3.3. Expresión génica que depende de actividad neuronal.
- 1.2.3.4. Remodelado sináptico neuronal.

2. OBJETIVOS	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1. Sujetos experimentales	49
3.2. Irradiación con rayos X	49
3.3. Inactivación farmacológica de la actividad del hipocampo	49
3.3.1. Fármacos.	
3.3.2. Implantación de cánulas.	
3.3.3. Administración del fármaco.	
3.4. Electrofisiología	52
3.4.1. Implantación de electrodos.	
3.4.2. Adquisición y análisis de registros.	
3.4.3. Protocolos de estimulación y registro.	
3.5. Pruebas conductuales	55
3.6. Sacrificio y extracción de tejido	57
3.7. Análisis de expresión génica	58
3.7.1. Extracción de ARN.	
3.7.2. Cuantificación de ARN obtenido.	
3.7.3. Retrotranscripción.	
3.7.4. PCR semicuantitativa.	
3.7.5. Electroforesis de ADN.	
3.7.6. Cuantificación de ADN obtenido.	
3.8. Histología	62
3.8.1. Tinción de Nissl.	
3.8.2. Inmunohistoquímica.	
3.8.3. Inmunofluorescencia.	
3.8.4. Captura y análisis de imagen.	
3.9. Análisis estadístico	68
4. RESULTADOS	69

4.1. Modificación de un protocolo clásico de eliminación de neurogénesis para nuevas aplicaciones: Caracterización del modelo.	73
4.1.1. Una única sesión de irradiación con rayos X a baja intensidad provoca una eficiente y selectiva ablación de la neurogénesis hipocampal adulta.	73
4.1.2. Una única sesión de irradiación con rayos X en el animal despierto e inmovilizado no afecta a las capacidades sensoriomotoras de ratones adultos.	78
4.1.3. Una única sesión de irradiación con rayos X no provoca alteraciones en las propiedades electrofisiológicas del hipocampo adulto.	79
4.2. Estudio de la implicación de la neurogénesis hipocampal adulta en la adquisición y formación de memorias, y en los cambios de eficiencia sináptica duraderos.	83
4.2.1. La neurogénesis hipocampal participa en la adquisición de información y la formación de memorias duraderas en paradigmas que dependen del hipocampo.	83
4.2.2. La formación de memorias de reconocimiento de objetos y evitación pasiva requieren distinta demanda temporal de la neurogénesis hipocampal adulta.	86
4.2.3. La inducción de potenciación sináptica duradera requiere de la neurogénesis hipocampal adulta.	88
4.3. Papel de la neurogénesis hipocampal adulta en la modificación de memorias.	91
4.3.1. La neurogénesis hipocampal adulta participa únicamente en la actualización de memorias ya almacenadas.	91
4.3.2. El proceso de reconsolidación con novedad requiere de la neurogénesis hipocampal adulta con la misma demanda temporal que el proceso de consolidación de memorias de reconocimiento de objetos.	93

4.4. Reclutamiento de neuronas maduras e inmaduras por el circuito hipocampal en el procesamiento de información de reconocimiento de objetos.	97
4.4.1. La neurogénesis hipocampal adulta modula la activación neuronal del hipocampo durante algunas fases de la formación/modificación de memorias de reconocimiento de objetos.	97
4.4.2. Las neuronas inmaduras adultas son reclutadas por el circuito hipocampal durante el procesamiento de novedad en el reconocimiento de objetos.	102
5. DISCUSIÓN.....	105
5.1. Necesidad de un método para el abordaje del papel de la neurogénesis adulta en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo.	107
5.2. Las neuronas inmaduras adultas participan en los procesos de aprendizaje y memoria que dependen del hipocampo.	110
5.3. La neurogénesis hipocampal adulta interfiere en los procesos de plasticidad sináptica duradera.	112
5.4. La neurogénesis hipocampal adulta es necesaria en el proceso de modificación de memorias ya almacenadas.	114
5.5. Las neuronas inmaduras son reclutadas por los circuitos activos del procesamiento de información y modulan la actividad neuronal.	115
6. CONCLUSIONES.....	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXOS	141
Anexo 1 Suárez Pereira, I. y col (2015) Hippocampus Material Suplementario	
Anexo 2 Suárez Pereira, I. & Carrión, AM. (2015) Scientific Report Material Suplementario	



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Neurogénesis adulta.

***1.2. Bases celulares y moleculares
del aprendizaje y la memoria.***

1. NEUROGÉNESIS ADULTA.

1.1. Antecedentes: Visión histórica de la neurogénesis adulta.

Hace más de un siglo que Santiago Ramón y Cajal, además de demostrar la individualidad de las células nerviosas (1888), concluyó en sus estudios sobre la regeneración del sistema nervioso que “no se generan nuevas neuronas después del nacimiento” (1913), lo cual se convirtió en un dogma muy importante en el campo de la neurociencia. La existencia de génesis de nuevas neuronas en el cerebro adulto, es un concepto relativamente nuevo para la ciencia (revisado por Gross, 2000). Hasta hace poco se pensaba que nacemos con un determinado número de neuronas, las cuales vamos desarrollando en el periodo de la infancia, y una vez desarrolladas, son las que nos acompañarán e incluso se irán perdiendo a lo largo de nuestra vida.

El establecimiento del concepto de neurogénesis adulta se logró gracias al aporte de pequeños avances de muchos investigadores. De hecho, no fue descubierta hasta mediados del siglo XX, en la década de los 60, cuando Joseph Altman, utilizando la técnica de autorradiografía con timidina tritiada (timidina-3H) para marcar células en división (Sidman y col., 1959), demostró la existencia de neurogénesis en algunas áreas del cerebro posnatal y adulto de la rata, específicamente en el bulbo olfatorio y el giro dentado de hipocampo (Altman, 1962a, 1962b, 1963 y 1969; Altman y Das, 1965a y 1965b). Sin embargo, estos estudios recibieron poca atención durante los años siguientes, ya que la funcionalidad de este proceso era vista con escepticismo.

A pesar de ello, se continuaron haciendo importantes aportaciones. A finales de los 70, Kaplan y colaboradores demostraron la supervivencia de estas nuevas neuronas, así como su capacidad de recibir conexiones sinápticas de otras neuronas (Kaplan y Hinds, 1977; Kaplan y Bell, 1983). Poco después, Stanfield y Trice descubrieron que los axones de las nuevas neuronas establecían sinapsis con sus neuronas dianas (Stanfield y Trice, 1988). Además, los estudios con pájaros cantores de Nottebohm establecieron que las nuevas neuronas participaban en el aprendizaje de nuevos cantos en la estación de cría (Goldman y Nottebohm, 1983; Paton y Nottebohm, 1984). Sin embargo, no fue hasta la década de los años 90, cuando la neurogénesis adulta fue aceptada y se consideró un tema científico de interés. A esto contribuyó la publicación de trabajos donde se aislaron las células fuente de nuevas neuronas, las células madre/troncales neurales (Reynolds y Weiss, 1992), la identificación y caracterización del proceso de neurogénesis adulta en hipocampo y bulbo olfatorio (Lois y Álvarez-Buylla, 1993; Gage y col., 1995;

Kuhn y col., 1996) y el descubrimiento de la presencia de neurogénesis en primates no humanos (Gould y col, 1997 y 1999a; Kornack y Rakic, 1999) y en humanos (Eriksson y col., 1998; Kukekov y col, 1999).

En el resurgimiento del interés por la neurogénesis adulta, tuvo gran importancia el avance de las técnicas metodológicas. Entre otras, cabe destacar el marcaje con timidina tritiada combinada con técnicas inmunohistoquímicas para demostrar el carácter neuronal de las nuevas células generadas (Cameron y col., 1993); el uso de análogos de timidina como sustitutos del marcaje radiactivo que permitió visualizar las neuronas de nueva generación mediante dobles y triples inmunomarcajes combinado con microscopía confocal (Gratzner, 1982; Kuhn y col., 1996) y el marcaje mediante la infección con retrovirus modificados genéticamente de los progenitores neuronales desde sus estadios más tempranos hasta la maduración de las nuevas neuronas maduras (Sanes y col., 1986; Price y col., 1987; van Praag y col., 2002).

1.2. Proceso de neurogénesis en el cerebro adulto.

La neurogénesis adulta consiste en el proceso de generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto, una vez ha cesado el desarrollo. Este proceso comprende desde las señales que inducen la división de la célula precursora hasta su diferenciación y establecimiento definitivo como nueva neurona funcional en la red neuronal y sináptica preexistente (Kempermann, 2011a).

Las zonas del cerebro capaces de producir nuevas neuronas se conocen como regiones neurogénicas. En el cerebro adulto de mamíferos, se han identificado dos regiones claramente definidas por la presencia de células madre o precursores neuronales: la zona subventricular de los ventrículos laterales (SVZ, del inglés “subventricular zone”) y la zona subgranular (SGZ, del inglés “subgranular zone”) del giro dentado (GD) de hipocampo (Álvarez-Buylla y Lim, 2004; Ming y Song 2011; Gage y Temple, 2013) (**Fig.1**). En ambas regiones se generan nuevas neuronas durante toda la vida del animal, aunque la tasa de producción puede cambiar con la edad según la especie. Los precursores neuronales situados en la SVZ migran a lo largo de la corriente migratoria rostral, hasta alcanzar el bulbo olfatorio, donde se diferencian y maduran a interneuronas; mientras que, las situadas en la SGZ dan lugar a células granulares del giro dentado, donde se conectarán sinápticamente con las vías aferentes procedentes de la corteza entorrinal y enviarán sus axones con información eferente a las neuronas piramidales de CA3.

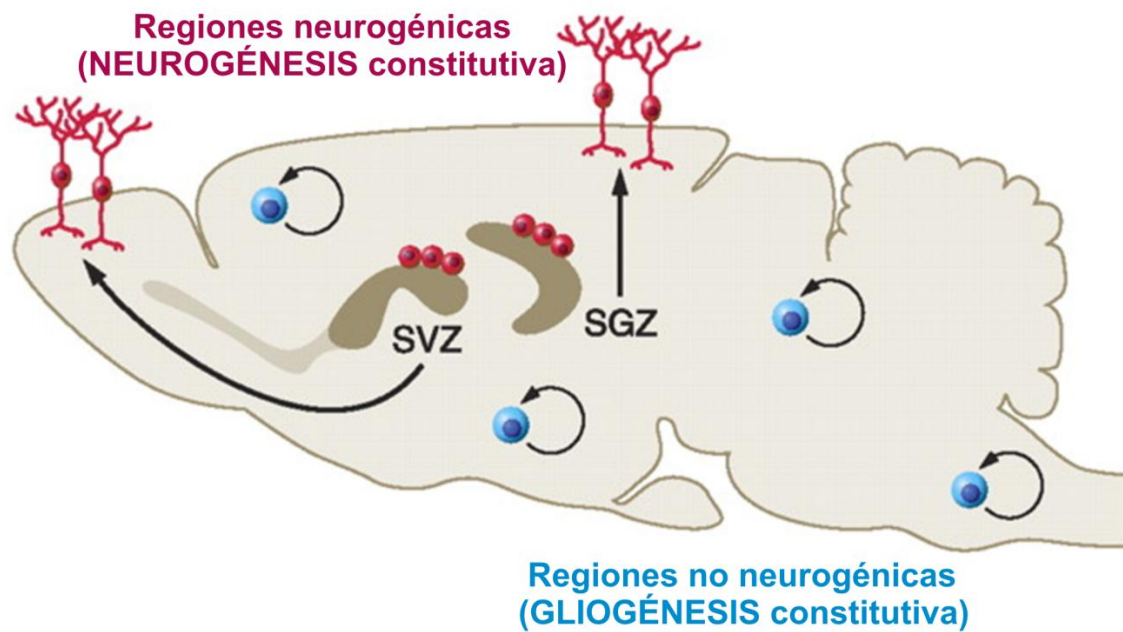


Figura 1. Regiones neurogénicas y no neurogénicas. La generación de nuevas neuronas está restringida en cerebro adulto de ratón a dos regiones: el hipocampo (SGZ, zona subgranular de giro dentado) y los ventrículos laterales (SVZ, zona subventricular de los ventrículos laterales) (neurogénesis constitutiva en rojo). Son varias las regiones no neurógenas de las cuales se han hallado evidencias de su potencial neurogénico bajo un determinado estímulo o circunstancia, aunque en condiciones fisiológicas producen únicamente células gliales (gliogénesis constitutiva en azul). *Modificado de Martino y col., 2010.*

La capacidad neurogénica fuera de estas dos regiones es una cuestión muy controvertida. La presencia de células madre o precursores neurales se ha descrito en varias zonas del cerebro adulto, incluyendo estriado, corteza, hipotálamo, amígdala, sustancia negra y corteza piriforme (Palmer y col., 1995; Bernier y col., 2002; Lie y col., 2002; Markakis y col., 2004; Dayer y col., 2005; Kokoeva y col., 2005; Cameron y Dayer, 2008; Feliciano y Bordey, 2013; Yuan y col., 2015). La mayor parte de los investigadores apoyan la idea de que, en condiciones fisiológicas las regiones no neurogénicas producen únicamente células gliales, mientras que la formación de nuevas neuronas en estas regiones se produce solo tras un daño o un estímulo patológico, como puede ser un infarto cerebral, por ejemplo (Ming y Song, 2005).

Aunque tanto en las regiones neurogénicas como en las no neurogénicas en el cerebro adulto existen precursores neurales, en las regiones no neurogénicas éstos no están organizados en grupos y además, carecen a priori del microambiente permisivo necesario para la formación de neuronas, aunque sí para la generación de células gliales (Suhonen y col., 1996) (**Fig.1**).

El microambiente permisivo para la generación de neuronas, conocido como nicho de células madre o nicho germinativo, consta de varios componentes. En primer lugar, las propias células precursoras (células madre, progenitores), que se caracterizan principalmente por dos propiedades: ser capaces de autorenovarse ilimitadamente y ser multipotentes, es decir, poseer la capacidad de diferenciarse a diferentes tipos celulares (McKay 1997; van der Kooy y Weiss, 2000; Weissman y col., 2001) (**Fig.2**). Por otro lado, el nicho neurogénico también se compone de astrocitos (Song y col., 2002; Barkho y col., 2006), vasos sanguíneos (Palmer y col., 2000; Shen y col., 2004), microglía (Agasse y col., 2004; Carpentier y Palmer, 2009), y componentes extracelulares, como la matriz extracelular (Mercier y col., 2002; Kerever y col., 2007). La interacción de los precursores con todos estos componentes, interacciones célula-célula, moléculas de la matriz extracelular y sustancias difusibles que llegan a la región neurogénica, juega un papel crítico en la regulación de la neurogénesis adulta pudiendo afectar a la proliferación, autorenovación, potencialidad, diferenciación, supervivencia y migración celular (**Fig.3**).

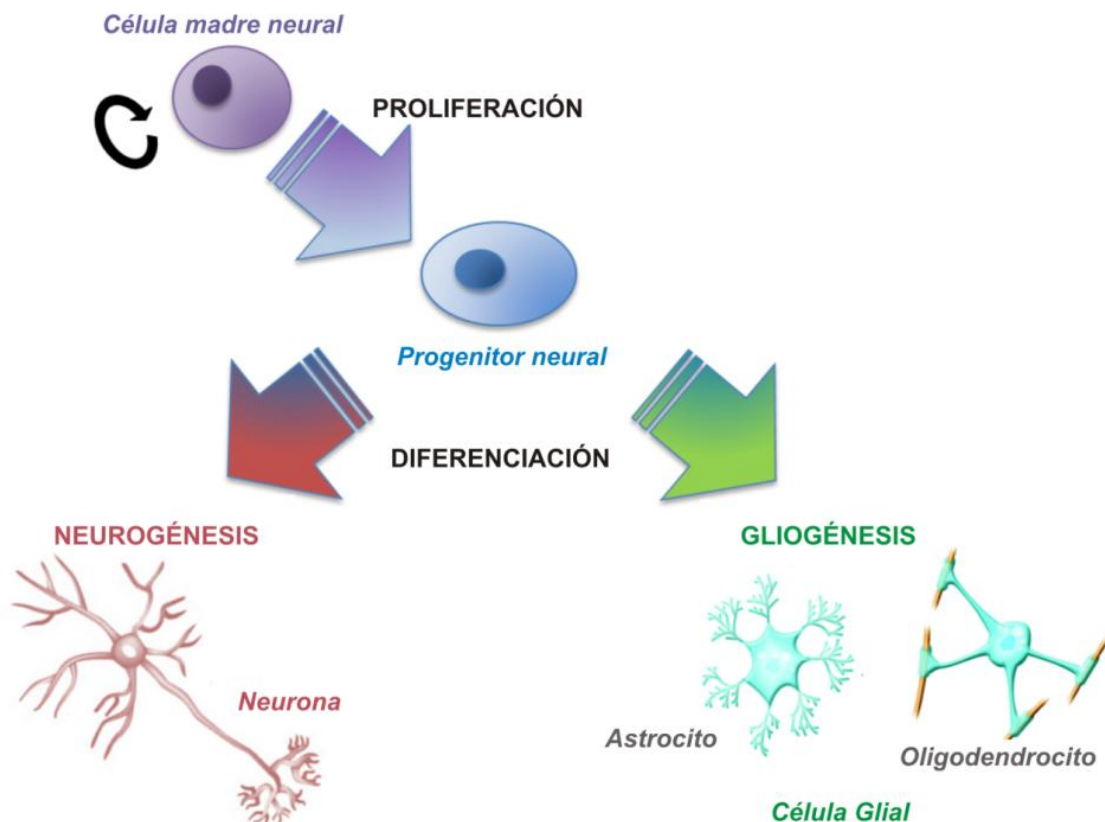


Figura 2. Proceso de autorenovación y diferenciación de células madre neurales. Las células madre neurales se dividen para su autorenovación y/o proliferan dando lugar a progenitores, que posteriormente se someten a procesos de diferenciación para la restricción de su linaje neuronal (neurogénesis) o glial (gliogénesis). *Modificado de Silbereis y col. 2010 y Lledo y col. 2005.*

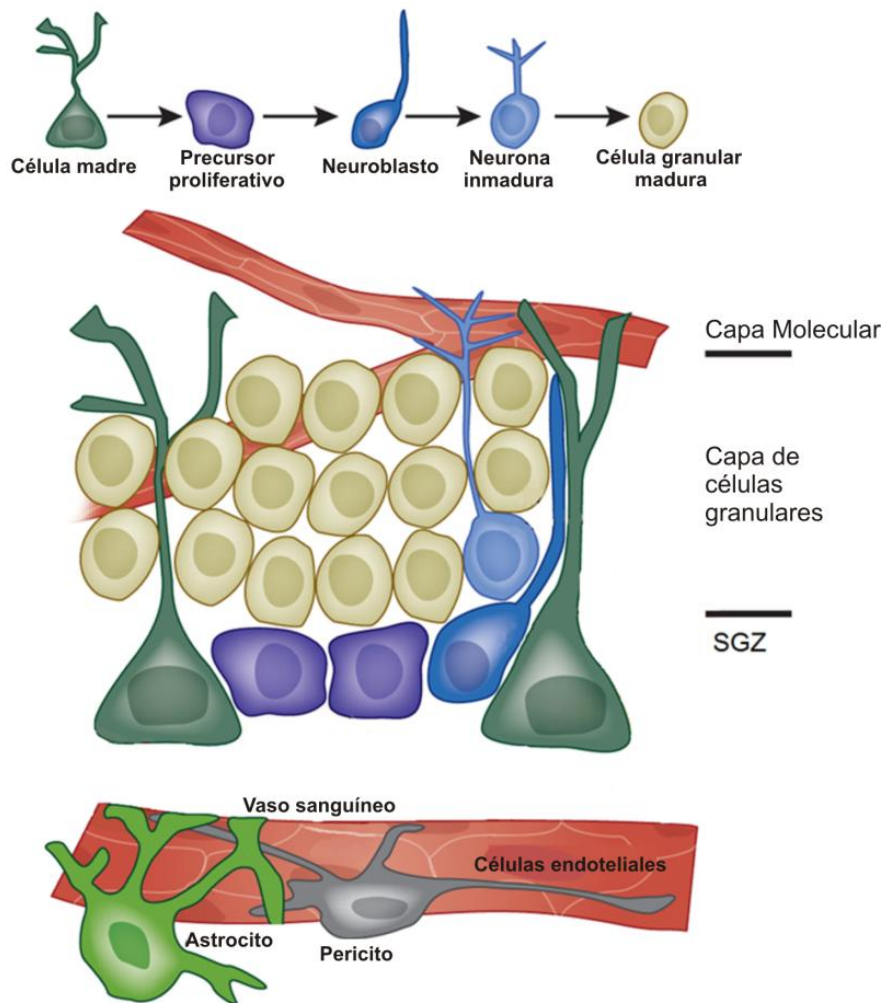


Figura 3. Ejemplo de composición de un nicho germinativo (SGZ del giro dentado). En la generación de nuevas neuronas es esencial que se establezca un microambiente permisivo, en cual las células madre interactúan con otros componentes: astrocitos, microglía, vasos sanguíneos y matriz extracelular. Así, las células madre neuronales de la SGZ (zona subgranular) proliferan y se diferencian en neuronas inmaduras, que luego maduran en neuronas granulares en el propio giro dentado. *Modificado de Goldman y col., 2011.*

1.3. Neurogénesis hipocampal adulta.

1.3.1. Anatomía del hipocampo.

El hipocampo es una estructura cerebral dispuesta bilateralmente y que desempeña importantes funciones en los procesos cognitivos. Anatómicamente, el hipocampo comprende: el subículo, el *cornu ammonis* (CA) o cuerno de Amón (que se subdivide en las regiones CA1, CA2 y CA3), el giro dentado (GD). La forma tridimensional de dicha estructura es relativamente compleja, ya que su eje longitudinal se dobla formando una “C invertida” y se extiende desde el septum (dorso-rostral) al lóbulo temporal (ventro-caudal) del cerebro, denominándose eje “septo-temporal” en roedores (Amaral y Witter, 1989) (**Fig.4**).

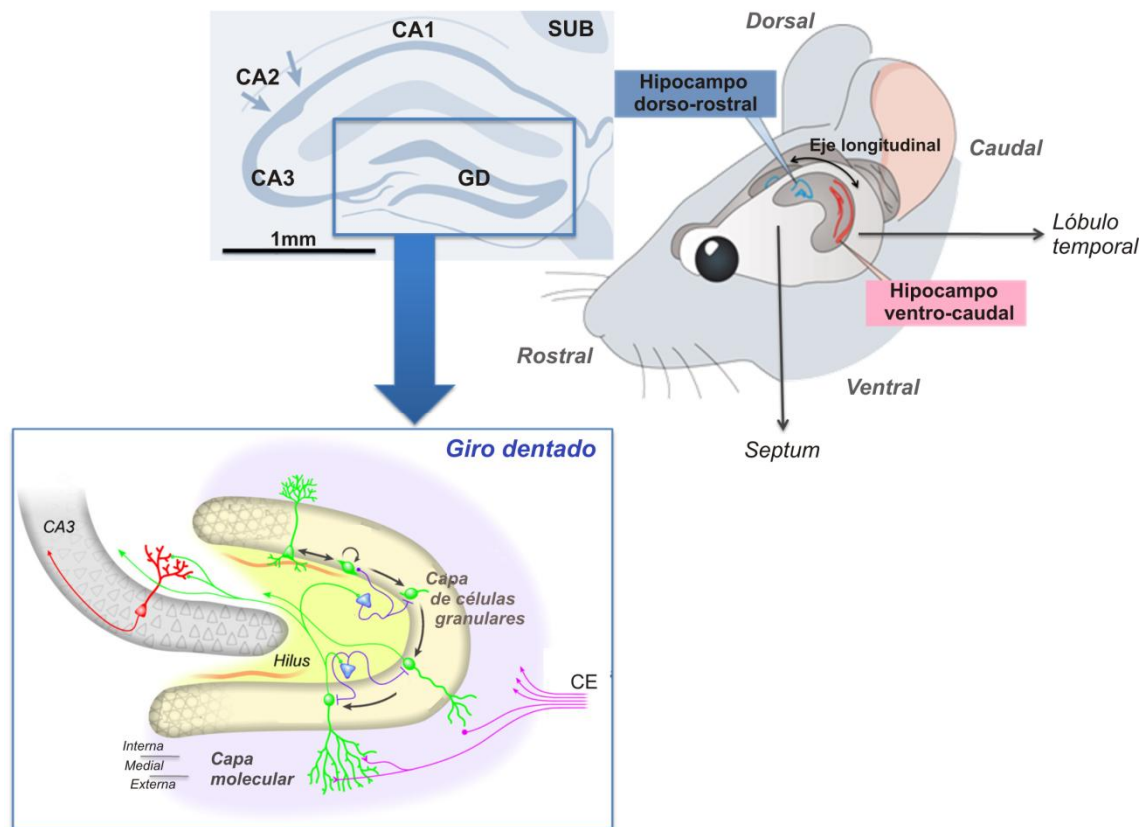


Figura 4. Anatomía y organización del hipocampo en el cerebro adulto de ratón. Esquema de la anatomía 3D del hipocampo en el cerebro adulto de ratón. El eje longitudinal se extiende desde el septum (dorso-rostral) al lóbulo temporal (ventro-caudal) del cerebro. Arriba a la izquierda, se muestran los componentes de la formación hipocampal (SUB, Subículo; GD, giro dentado; CA1, CA2 y CA3) en un corte dorso-rostral y coronal en el cerebro de ratón adulto. Abajo a la izquierda, se detalla anatómicamente la estructura del giro dentado en el cual tiene lugar el proceso de neurogénesis. Los axones de las neuronas de la corteza entorrinal (CE, principal aferencia) se segregan en la capa molecular medial o externa del giro dentado de acuerdo a su procedencia. Los axones de las células granulares se ramifican y contactan con las interneuronas del *hilus* y las células piramidales de CA3. Modificado de Zhao y col., 2008a; Bannerman y col., 2014 y Strange y col., 2014.

En el giro dentado es donde tiene lugar el proceso de neurogénesis hipocámpal adulta. Este posee una organización en capas. En concreto, los precursores neuronales se localizan en la zona subgranular (SGZ), que queda delimitada por la capa de somas de las células granulares y el hilus. Las neuronas granulares de GD presentan su aferencia en la capa molecular y su eferencia en el *hilus* y CA3. A su vez, la capa molecular comprende 3 subcapas (interna, medial y externa) con axones de diferente procedencia que proporcionan especificidad de los estímulos que llegan a cada porción del árbol dendrítico de las células granulares (Forster y col., 2006). Además, estas bandas de la capa molecular presentan diferente conectividad a lo largo del eje septo-temporal: mientras que la región que proyecta al hipocampo dorsal de roedores recibe proyecciones de la neocorteza, la región que proyecta al hipocampo ventral recibe aferentes de la corteza prefrontal, la amígdala, el

hipotálamo y otros núcleos subcorticales (Strange y col., 2014). Esta segregación en las entradas sinápticas contribuye a la marcada diferencia anatómica y funcional que caracteriza al eje longitudinal del hipocampo (**Fig.4**).

1.3.2. Eventos del proceso de neurogénesis hipocampal adulta.

En el proceso de generación de nuevas neuronas en la SGZ de GD de hipocampo tienen lugar los siguientes eventos (Halbach, 2007) (**Fig.5**).

1. Proliferación.

La neurogénesis en el hipocampo es posible debido a la presencia de células madre, que proliferan generando células progenitoras neurales (Kempermann, 2011a). En roedores, la duración del ciclo mitótico de los precursores dura entre 12 y 24 horas, lo que lleva a la producción de aproximadamente entre 8.000 y 10.000 nuevas neuronas por día (Cameron y McKay, 2001; McDonald y Wojtowicz, 2005). Dado que el GD consiste de aproximadamente un millón de células granulares (35% del total del hipocampo), este fenómeno es capaz de generar un poco menos de 1% del total de células granulares cada día. Sin embargo, se ha estimado que en condiciones normales la tasa de muerte de las nuevas células generadas es alrededor del 50% durante su primer mes de vida, disminuyendo esta con la edad de la nueva neurona (Dayer y col., 2003). Probablemente, al final sólo sobreviven aquellas nuevas neuronas capaces de establecer contactos sinápticos funcionales con otras neuronas, al igual que ocurre durante el desarrollo (Burek y Oppenheim, 1996).

2. Diferenciación.

Las células progenitoras neurales pueden producir múltiples tipos de células en el sistema nervioso central, tales como neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, o células microgliales (Zhao y col., 2008b). Predominantemente se generan nuevas células de fenotipo neuronal (75%), principalmente células granulares glutamatérgicas, pero también algunas interneuronas en cesta GABAérgicas (14%). Una menor proporción de células se diferencian en astrocitos (15%), oligodendrocitos o microglía (Steiner y col., 2006). Estas proporciones de producción de los distintos tipos celulares en relación al total de células generadas pueden variar según factores como la edad, especie o circunstancias anómalas, como lesión o enfermedad.

3. Migración.

Las nuevas neuronas hipocampales no migran grandes distancias, sino que se producen en la SGZ y tienen su destino a pocas micras de distancia en la capa granular, en el propio GD, donde maduran y se integran en circuitos ya existentes.

4. Contacto dendrítico y axonal.

Las nuevas neuronas generadas a los 10-14 días de edad extienden sus dendritas dentro de la capa molecular del GD y envían su axón hacia CA3, donde posteriormente contactan con neuronas piramidales (Zhao y col., 2006).

5. Integración sináptica.

Las nuevas células establecen sus contactos sinápticos funcionales y completan su maduración hasta células granulares maduras. En este momento, reciben entradas aferentes procedentes de la corteza entorrinal en las dendritas localizadas en la capa molecular. Al mismo tiempo, establecen contactos con sus células diana, con las neuronas piramidales de CA3 e interneuronas del *hilus* (Toni y col., 2008).

1.3.3. Etapas/fases del proceso de neurogénesis hipocampal adulta.

La neurogénesis hipocampal adulta en ratón dura 8 semanas y comprende 4 fases (Kempermann, 2011a) (**Fig.5**):

1. Fase de precursores celulares.

En esta fase tiene lugar la proliferación de los precursores celulares. El primer estadio de precursores (células tipo-1) tiene propiedades que recuerdan a las células gliales, incluyendo la morfología de la glía radial. El cuerpo de la célula se encuentra en la SGZ y las dendritas se extienden dentro de la capa molecular. La naturaleza astrocítica de los precursores hipocampales fue revelado por primera vez por el grupo de Álvarez-Buylla (Seri y col., 2001). Los precursores tipo-1 producen células progenitoras intermedias, o células de tipo 2, con una alta actividad proliferativa. Un subconjunto de estas células continúan expresando marcadores gliales, pero carecen de las características morfológicas de las células radiales (células tipo-2a). Y otras expresan ya marcadores propios de fenotipo neuronal (células tipo-2b) (Steiner y col., 2006). Estas células tipo-2 en desarrollo reciben las primeras entradas sinápticas GABAérgicas, siendo particularmente sensibles a dicha estimulación (Tozuka y col., 2005; Wang y col., 2005). Del mismo modo, las células tipo-1 responden a estos estímulos mediante el aumento de la proliferación celular (Hüttmann y col., 2003).

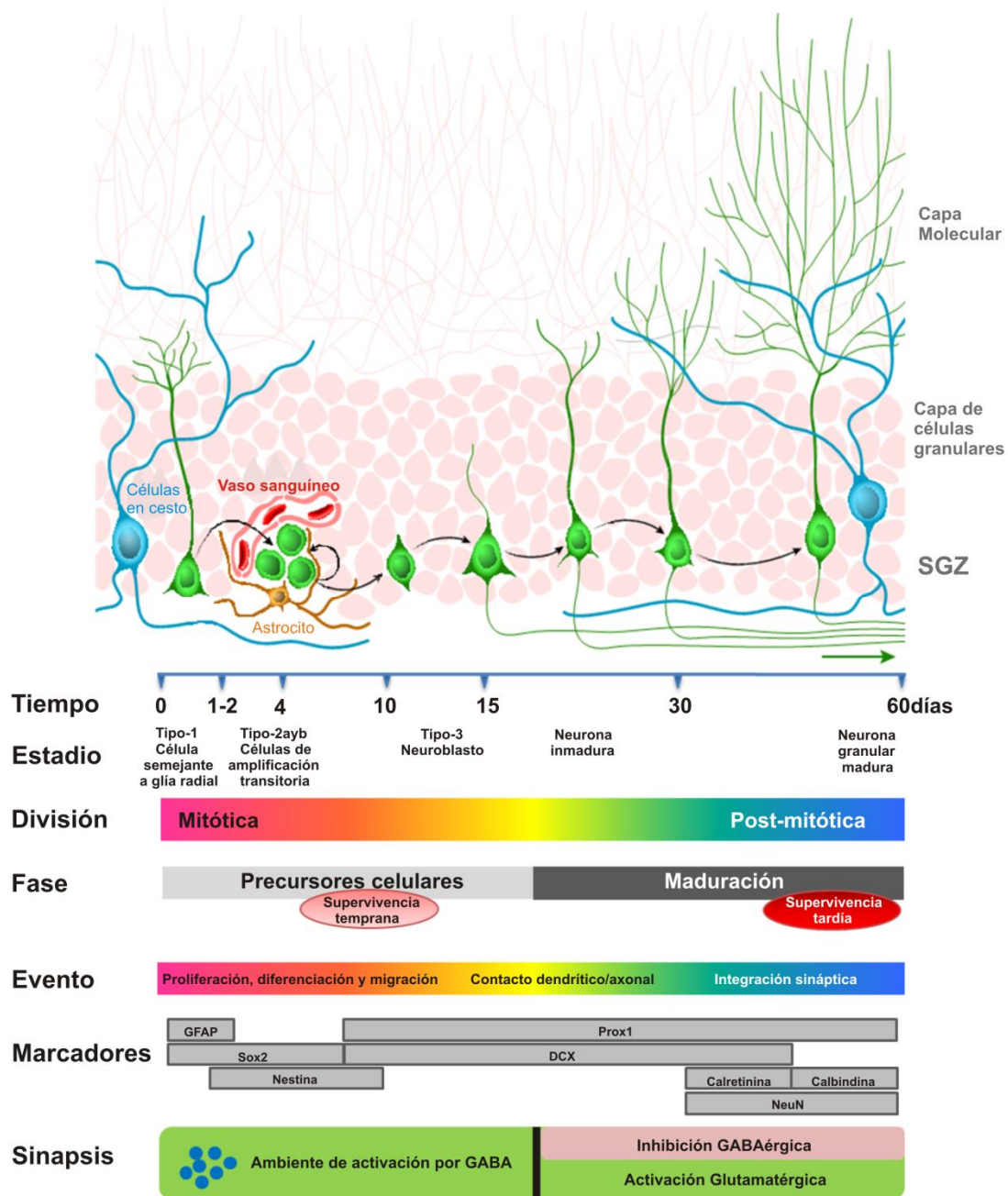


Figura 5. Esquema temporal del desarrollo de nuevas neuronas granulares adultas en el GD de ratón. Secuencia propuesta de tipos celulares en la neurogénesis del hipocampo adulto. Seis estadios de desarrollo neuronal pueden identificarse según morfología, capacidad proliferativa, expresión de marcadores y conectividad sináptica. *Modificado de Encinas y col., 2011 y Aimone y col., 2014.*

De las células tipo 2b, surgen las células tipo-3, o también llamadas neuroblastos, que suponen el estadio de transición entre la célula proliferativa (con capacidad de división) y la post-mitótica (madurando morfológicamente hacia neurona inmadura). Los neuroblastos tienen propiedades de células migratorias, alcanzando su posición final en el tercio externo de la capa de células granulares (Kempermann y col., 2003).

2. Fase de supervivencia temprana.

La fase de supervivencia temprana elimina el exceso de células precursoras inmaduras de linaje neuronal generadas en la fase anterior. La mayoría de estas células no logran establecer conexiones y mueren antes de su plena integración en el circuito hipocampal. El mecanismo exacto por el cual se induce este proceso aún es desconocido (Kempermann y col., 2003). Aunque la tasa de supervivencia celular temprana depende de la especie e incluso de la estirpe dentro de la misma especie de estudio (Kempermann y col., 1997a), en todos los casos las células que sobreviven a esta fase, es probable que sobrevivan durante mucho tiempo.

3. Fase post-mitótica de maduración.

Las células tipo-3 (y posiblemente algunas tipo-2b) salen del ciclo celular y como neuronas inmaduras comienzan la diferenciación post-mitótica a células granulares. En esta fase tiene lugar la maduración morfológica y funcional de las nuevas neuronas (Stanfield y Trice, 1988; Hastings y Gould, 1999; Markakis y Gage, 1999). Estas células se caracterizan por un núcleo redondeado y soma ligeramente triangular con una dendrita apical ramificada. Una vez establecida la conectividad axonal con CA3, se producen las primeras sinapsis glutamatérgicas coincidiendo con un periodo de incremento de plasticidad (Schmidt-Hieber y col., 2004) y el desarrollo de espinas dendríticas (Zhao y col., 2006). Casi al mismo tiempo se establecen sinapsis en las espinas, dendritas y somas de las nuevas neuronas (sinaptogénesis). El proceso de maduración se completa entorno a los dos meses (Toni y col., 2007; Sandoval y col., 2011).

4. Fase de supervivencia tardía.

Al final de su maduración, se produce una segunda fase crítica de supervivencia y estabilización de las nuevas neuronas. Solo aquellas nuevas neuronas que completan su desarrollo y maduración y alcanzan a integrarse en los circuitos cerebrales activos sobreviven a esta etapa, de lo contrario, degeneran. De hecho, las nuevas neuronas generadas no muestran ninguna propiedad que permita distinguirlas de las células granulares ya existentes (Laplagne y col., 2006).

1.3.4. Maduración morfológica de las nuevas neuronas. Estadios neurogénicos.

A continuación, se describen las características de los diferentes intermediarios neurogénicos y se indican los marcadores histológicos

característicos de cada uno de ellos, rigiéndonos por la clasificación propuesta por Kempermann (Filippov y col., 2003; Kempermann y col., 2004) (**Fig.5**):

- Células tipo-1.

Estas células constituyen el reservorio de células madre situados en la SGZ. Son de naturaleza astrocítica y expresan los marcadores GFAP, Sox2 y Nestina. Morfológicamente poseen una larga dendrita apical que presenta su inicio en la capa de células granulares y llega a la capa molecular interna donde extiende una abundante arborización. Se encuentran en contacto con el sistema vascular y se dividen poco, aunque pueden hacerlo de forma asimétrica.

- Células tipo-2.

Estas células son altamente proliferativas y derivan de la división de las células tipo-1. La división celular se produce en grupos entorno a vasos sanguíneos y a las células tipo-1. Estas células carecen de morfología glial y constituyen la transición entre el fenotipo glial y neuronal. Se distinguen dos subtipos:

Tipo-2a: son células de amplificación transitoria que ya no expresan GFAP, pero si Nestina y Sox2.

Tipo-2b: son células de amplificación transitoria menos proliferativas, que continúan siendo positivas para Nestina, aunque muestran claros signos de fenotipo neuronal, con la expresión de DCX, PSA-NCAM y Prox1.

- Células tipo-3.

También llamadas neuroblastos, constituyen la transición entre la célula proliferativa y la post-mitótica inmadura. Son células mitóticas, aunque con baja capacidad de división. Morfológicamente, presentan un núcleo redondeado con una ligera dendrita apical, dejan de expresar Nestina, pero mantienen los marcadores de DCX y PSA-NCAM.

- Neurona inmadura.

Este estadio neurogénico muestra una morfología próxima a la célula granular, posee núcleo redondeado, soma ligeramente triangular con una dendrita apical poco ramificada y plena conexión funcional dentro del circuito hipocampal. Cuando los neuroblastos se vuelven neuronas inmaduras postmitóticas, comienzan a expresar Calretinina, además de DCX, Prox1 y NeuN.

- Neurona granular madura.

Las nuevas neuronas tras su completa maduración son indistinguibles de las neuronas granulares ya existentes. Pasan a expresar Calbindina, Prox1 y NeuN.

1.3.5. Integración de las nuevas neuronas en el circuito hipocampal.

Al igual que durante el desarrollo, las nuevas neuronas adultas siguen el mismo proceso para su integración en el circuito hipocampal: etapa inicial con silenciamiento sináptico, estimulación GABAérgica de carácter excitatorio, entradas glutamatérgicas y estimulación GABAérgica de carácter inhibitorio (Espósito y col., 2005; Vivar y van Praag, 2013) (**Fig.5**).

El GABA es el mayor neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto. Sin embargo, es capaz de jugar diferentes papeles sobre las células madre y su progenie (Pallotto y Deprez, 2014). De hecho, se ha demostrado la presencia de receptores GABAérgicos funcionales en precursores neurogénicos (Tozuka y col., 2005; Wang y col., 2005). Una vez se determina el fenotipo neuronal, antes de recibir entradas sinápticas, las nuevas neuronas son activadas por GABA (efecto excitador) liberado en sitios extra-sinápticos (Demarque y col., 2002). Este efecto excitador del GABA regula el umbral de excitabilidad de las nuevas neuronas, así como determina su futuro desarrollo, en cuanto a maduración, integración y función (Ge y col., 2006; Glykys y Mody, 2006; Walker y Semyanov, 2008; Chancey y col., 2013).

Una vez superada la fase de supervivencia temprana, aparecen las primeras entradas glutamatérgicas. Curiosamente, las neuronas inmaduras ante estimulación glutamatérgica muestran temporalmente un umbral inferior para la inducción de potenciación sináptica duradera (LTP, del inglés “long-term potentiation”) que las neuronas granulares maduras (Ge y col., 2007). De hecho, ha sido descrito que la expresión de la subunidad NR2B del receptor de NMDA por parte de las neuronas inmaduras contribuye a que las neuronas inmaduras tengan menor umbral para la inducción de LTP (Ge y col., 2007).

Poco después de que ocurran las primeras entradas glutamatérgicas, se registran las primeras corrientes GABAérgicas inhibitorias a nivel perisomático. Las neuronas inmaduras reciben entradas inhibitorias locales de las tres subregiones del GD: capa molecular, capa de células granulares e *hilus* (Li y col., 2012). Con la maduración, la corriente GABAérgica inhibitoria aumenta gradualmente, debido tanto a un aumento de número de sinapsis como de su fuerza sináptica (Li y col., 2012).

Este aumento gradual de la inhibición, junto con los cambios fisiológicos intrínsecos de las neuronas jóvenes y la formación de sinapsis glutamatérgicas, establece un periodo en el que las nuevas neuronas son más fácilmente excitables, una característica única de las neuronas jóvenes durante su maduración (Kempermann, 2011a).

1.4. Estrategias de estudio del proceso de generación de nuevas neuronas.

El campo de la neurogénesis adulta progresó gracias a los avances técnicos que han facilitado la identificación y manipulación global o selectiva de las neuronas de nueva generación en el cerebro adulto. De este modo, el estudio de este proceso se puede abordar por diversos enfoques:

1. Análisis de células proliferativas.

Una información muy relevante en el estudio de la neurogénesis hipocampal es la proliferación de las células que van a generar nuevas células granulares. Para ello, se utilizan marcadores que nos permiten visualizar el proceso de división o marcar a la nueva célula. Así, es posible estimar parámetros como la tasa de proliferación o determinar la tasa de supervivencia. Estos marcadores son:

- Análogos de nucleótidos.

Son bases que compiten con las endógenas y se incorporan de manera estable en el ADN cuando se produce su replicación durante la fase S (síntesis) del ciclo celular. Así, mediante inmunohistoquímica, permiten medir la duración del ciclo celular (Cameron y McKay, 2001; Hayes y Nowakowski, 2002) o realizar análisis cuantitativos de proliferación, diferenciación y supervivencia (Miller y Nowakowski, 1988; Kempermann y col., 1997b). El primer análogo que se empezó a utilizar fue la timidina marcada radiactivamente con tritio (Friedkin y Wood, 1956; Messier y col., 1958). Hoy en día, este marcador ha sido sustituido por el empleo de otros análogos como la 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU) y sus derivados con cloro (CldU) o yodo (IdU) (Corotto y col., 1993; Kuhn y col., 1996). Estos análogos aportan la ventaja de poder realizar dobles o triples marcajes inmunofluorescentes, permitiendo así hacer abordajes más complejos en función del momento de administración.

Una objeción importante de estas técnicas es que la incorporación de estos análogos no solo es un indicador de división, ya que también se incorporan en los procesos de reparación de ADN dañado, aunque se produce con menor frecuencia (Selden y col., 1993).

- Antígenos celulares de proliferación celular.

Estos marcadores son proteínas que se expresan durante alguna/s fase/s del ciclo celular. Algunos de los más empleados son: PCNA (del inglés, “proliferating cell nuclear antigen”), que se expresa en la fase G1 y S (Hall y col., 1990) y Ki67, que se expresa en la fase G1 tardía, S, G2 y M (Starborg y col., 1996; Scholzen y Gerdes, 2000). Estos marcadores permiten confirmar y completar los datos obtenidos mediante la administración de análogos de nucleótidos.

2. Expresión de marcadores específicos de intermediarios neurogénicos.

Como hemos visto, es posible marcar e identificar los distintos estadios celulares que participan en el proceso de neurogénesis adulta en base a la expresión de distintas proteínas. A continuación, se describen con más detalle algunos de los marcadores de interés (Kempermann, 2011a):

Precursores neurales

- GFAP (del inglés, “glial fibrillary acidic protein”): Proteína ácida fibrilar de glía. Es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de células con fenotipo glial. Es un marcador característico de astrocitos reactivos maduros de cerebro adulto que además se expresa en precursores neurales (precursores neurogénicos tipo-1 y linaje glial). Aunque astrocitos y precursores expresan este marcador, su morfología es distinta, siendo unipolar o bipolar la de los precursores neurales y multipolar la de los astrocitos reactivos maduros.
- Nestina: Es un filamento intermedio del citoesqueleto intracelular específico neuronal, relacionado con el crecimiento del axón. Tras el descubrimiento y aislamiento de células precursoras en el cerebro adulto de mamíferos (Reynolds y Weiss, 1992), se describió que estos precursores que daban lugar a la generación de nuevas neuronas expresaban como marcador característico la Nestina (Yamaguchi y col., 2000). Sin embargo, ha sido descrito que no todos los precursores tipo-1 expresan Nestina (alrededor de dos tercios del total) y que también se expresa en células tempranas del tipo-2.
- Sox2 (del inglés, “sex determining región Y-box2”): Es un factor de transcripción esencial en el mantenimiento de las células madre no diferenciadas, implicado en la autorenovación e inducción de la pluripotencialidad (Lowry y col., 2008; Park y col., 2008). En cuanto a la neurogénesis adulta, se expresa tanto en células tipo-1 como tipo-2.

Células de amplificación transitoria

- Prox1 (del inglés, “prospero homeobox protein1”): Marcador específico del desarrollo de células granulares. Es un factor de transcripción mediador del mantenimiento de los progenitores intermedios y del proceso de maduración (células tipo-2b, tipo-3 y post-mitóticas) (Lavado y col., 2010).
- Doblecortina (DCX): Proteína asociada a microtúbulos que promueve su polimerización. En cuanto a la neurogénesis adulta, está presente en neuroblastos y neuronas jóvenes en migración (células tipo-2b, tipo-3 y post-mitóticas tempranas) (Francis y col., 1999; Gleeson y col., 1999), concretamente, en las proyecciones principales (Schaar y col., 2004) y el cono de crecimiento de las neuritas (Friocourt y col., 2003). Esta proteína está relacionada fundamentalmente con la migración celular, axogénesis y sinaptogénesis. Su expresión empieza, aunque con cierto solapamiento, cuando termina el de Nestina, tras la especificación neuronal (Kronenberg y col., 2003; Couillard-Despres y col., 2005 y Steiner y col., 2006). Así mismo, su expresión termina con cierto solapamiento con el inicio de expresión del marcador NeuN (Brandt y col., 2003; Brown y col., 2003 y Couillard-Despres y col., 2006).
- PSA-NCAM (del inglés, “polysialylated form of neural cell adhesion molecule”): Polímero de ácido siálico asociado a la molécula de adhesión celular neuronal. Los residuos de ácido siálico reducen la adhesión celular mediada por NCAM (Sadoul y col., 1983), por ello está presente en lugares de plasticidad y en nuevas neuronas migratorias. En el cerebro adulto, se expresa en las nuevas neuronas granulares generadas y en desarrollo (Seki y Arai, 1991, 1993a y 1993b; Seki, 2002a y 2002b), solapando su expresión casi completamente con la de DCX (Seki y Arai, 1999).

Células post-mitóticas

- Calretinina: Proteína reguladora del metabolismo del calcio intracelular. En las últimas fases del proceso de neurogénesis hipocampal adulta, las neuronas postmitóticas inmaduras expresan este marcador junto a DCX o NeuN (Nacher y col., 2002; Brandt y col., 2003). Además, es un marcador específico de neuronas no piramidales GABAérgicas que se pueden encontrar en todas las regiones del hipocampo (Jacobowitz y Winsky, 1991; Gulyas y col., 1992; Miettinen y col., 1992).

- Calbindina: Proteína reguladora del metabolismo del calcio intracelular. Esta proteína se expresa en todas las neuronas maduras del giro dentado, neuronas piramidales de corteza cerebral, hipocampo (CA1 y CA2) y en las células de Purkinje del cerebelo (Sequier y col., 1988; Seress y col., 1991 y 1992). En neurogénesis hipocampal adulta, se emplea como marcador de neurona granular madura (Rami y col., 1987; Eriksson y col., 1998; Liu y col., 1998; Nilsson y col., 1999; Domínguez y col., 2003).
- NeuN (del inglés, “neuronal nuclei”): Proteína nuclear soluble de neuronas postmitóticas (Mullen y col., 1992; Lind y col., 2005). Se expresa en la mayoría de las neuronas del sistema nervioso, por tanto es un marcador específico neuronal (Wolf y col., 1996). En la neurogénesis hipocampal adulta del giro dentado, sirve como marcador de todas las células postmitóticas, las maduras ya existentes en el cerebro maduro y las de nueva generación. Así, permite ayudar a diferenciar las distintas poblaciones mediante dobles marcajes junto a otras proteínas (DCX, Calretinina y/o Calbindina).

3. Seguimiento/visualización del proceso de neurogénesis.

En el estudio y caracterización del proceso de neurogénesis adulta ha sido crucial el avance en metodologías que nos permiten etiquetar células individualmente y seguirlas a través del espacio y/o tiempo. La base de estas técnicas es la expresión de un reportero integrado en las células de nuestro interés mediante infección por retrovirus o transgénesis.

Los retrovirus son virus capaces de infectar a células en división. Así, modificando el virus para que no sea virulento y contenga un gen reportero, podemos utilizarlos para infectar a los intermediarios neurogénicos en división. El virus se integra en la célula y se expresa, y con ello, también el gen reportero que codifica para, por ejemplo, una proteína fluorescente. Es un marcaje estable, pudiendo así analizar células en diferentes fases del desarrollo, dependiendo del tiempo que dejemos tras la infección o simultáneamente, programando múltiples infecciones con fluoróforos que se exciten/emitan a distintas longitudes de onda (Carlen y col., 2002; van Praag y col., 2002; Imayoshi y col., 2011).

Por otro lado, se han desarrollado múltiples estrategias para la manipulación genética de animales en poblaciones celulares restringidas. Su base son los sistemas de recombinasas específicas de sitio (SSRs; del inglés, “site-specific recombinases”), como el muy utilizado sistema Cre-loxP. En el caso de la neurogénesis adulta (Imayoshi y col., 2011), son cruzados ratones transgénicos que expresan una versión de la recombinasa Cre inducible bajo

un promotor que se exprese en células específicas (Nestina, GFAP, Sox2, DCX...) e inducible, con cepas de ratones reporteros que contienen una secuencia de parada de lectura flanqueada por los sitios de reconocimiento loxP de la actividad recombinasa ante una secuencia que codifica para una proteína fluorescente o LacZ (Branda y Dymecki, 2004). Así, en los dobles transgénicos, el gen reportero sufre la recombinación que elimina la secuencia de parada en las células que tengan activo el promotor que dirige la expresión de la recombinasa solo cuando se administre la sustancia inductora. Como resultado final, se obtiene la expresión de un marcador permanente en intermediarios neurogénicos (Metzger y col., 1995; Mao y col., 2001; Srinivas y col., 2001).

4. Métodos para reducir o incrementar la neurogénesis.

Nuestro cerebro contiene miles de millones de células y no solo ser capaces de discriminarlas individualmente, si no modificar su actividad, es crucial para entender los mecanismos y funcionalidad de unas pocas células en un circuito tan complejo. A continuación, enumeramos algunos de los métodos más utilizados con los cuales podemos reducir o incrementar el proceso de generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto:

- Irradiación, con rayos X o gamma, en cerebro completo o focalmente (Saxe y col., 2006). Los intermediarios neurogénicos son sensibles a la radiación ionizante, produciéndose la ablación del proceso de neurogénesis.
- Administración crónica de fármacos antimitóticos, como metilazoximetanol (MAM) (Ko y col., 2009), 5-fluorouracil (5-Fu) (Mustafa y col., 2008), temozolomida (TMZ) (Garthe y col., 2009) o citosina arabinosido (araC) (Wang y col., 2003). Inhiben la división de los estadios proliferativos.
- Administración de fármacos antidepresivos (revisado por Méndez-David y col., 2013), como fluoxetina (Encinas y col., 2006; Keith y col., 2007). Incrementan la proliferación celular y favorece la maduración dendrítica y la integración funcional de las nuevas neuronas.
- Ejercicio voluntario (Fischer y col., 2014) o enriquecimiento ambiental (Segovia y col., 2006). Incrementan el proceso de generación de nuevas neuronas o contrarrestan otras manipulaciones que lo reducen.
- Manipulación genética (Imayoshi y col., 2011). Es particularmente destacable el desarrollo de estrategias de inducción o ablación del proceso de neurogénesis mediante la combinación de sistemas

inducibles mediados por recombinasas específicas de sitio (sistema Cre dirigido por administración de tamoxifeno) o transgenes controlados por tetraciclina (sistema Tet dirigido por administración de doxíciclina). Por ejemplo, para expresión selectiva de genes suicidas como el de la toxina diftérica (DTA; del inglés, “diphtheria toxin fragment A”) (Imayoshi y col., 2008) o pro-apoptóticos como Bax (Dupret y col., 2008). Recientemente, también han sido generadas líneas de ratones transgénicos para la supresión de la neurogénesis adulta. En los ratones Nestina-TK y GFAP-TK se combina la expresión específica de la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK; del inglés, “herpes simplex virus thymidine kinase”) en precursores neurales que tras el tratamiento con ganciclovir (GCV), produce una específica e inducible ablación de células en división que expresan Nestina o GFAP, respectivamente (García y col., 2004; Saxe y col., 2006; Deng y col., 2009; Singer y col., 2009).

- Optogenética y farmacogenética. En general, estas técnicas recientemente desarrolladas suponen una potente y versátil herramienta para investigar la función de los sistemas neurales. En la optogenética, mediante mecanismos de selección específicos (infección de poblaciones celulares con virus que portan la construcción bajo un promotor de expresión condicional y/o específica al tipo celular), se hace que las células de interés expresen genes exógenos que codifican para proteínas sensibles a la luz, y así conseguir manipular de forma temporal y precisa el comportamiento celular. Estas proteínas son opsinas microbianas, canales iónicos que se activan por luz en la escala de tiempo de milisegundos y disponibles tanto para permitir la activación como la inhibición de las células que los porten en su membrana (Zhang y col., 2007, Pastrana, 2010). Por otro lado, también han sido desarrolladas tecnologías farmacogenéticas, por activaciones químicas o silenciamiento génico dirigido a poblaciones celulares específicas, que incluyen: receptores de activación exclusiva por ligandos sintéticos (RASSLs, del inglés, “receptor activated solely by a synthetic ligand”) o drogas de diseño (DREADD, del inglés, “designer receptor exclusively activated by designer drugs”) (Alexander y col., 2009; Deng y col., 2010); moléculas para la inactivación de la transmisión sináptica (MISTs, del inglés, “molecules for inactivation of synaptic transmission”) (Karpova y col., 2005) y silenciamiento por expresión dirigida del receptor de allostatina (AlstR, del inglés, “allatostatin receptor”) (Tan y col., 2006), canales de cloruro ligados a glutamato sensibles a ivermectina (GluClab) (Lerchner y col., 2007) o receptores modificados GABA-A (Wulff y col., 2007) o TRPV1 (Arenkiel y col., 2008).

1.5. Factores que regulan la neurogénesis en el cerebro adulto.

La neurogénesis en el cerebro adulto no constituye un proceso biológico uniforme en el tiempo (Kempermann, 2011b). Diversos factores modulan la tasa de neurogénesis adulta regulando diferentes etapas, aunque el mayor punto de control es la proliferación de los progenitores neurales (**Fig.6**). No se conocen en profundidad, pero la neurogénesis puede ser estimulada o inhibida por diversos factores, tanto internos (intrínsecos al organismo) como externos (ambientales o de administración exógena de fármacos) (Aimone y col., 2014) (**Fig.7**).

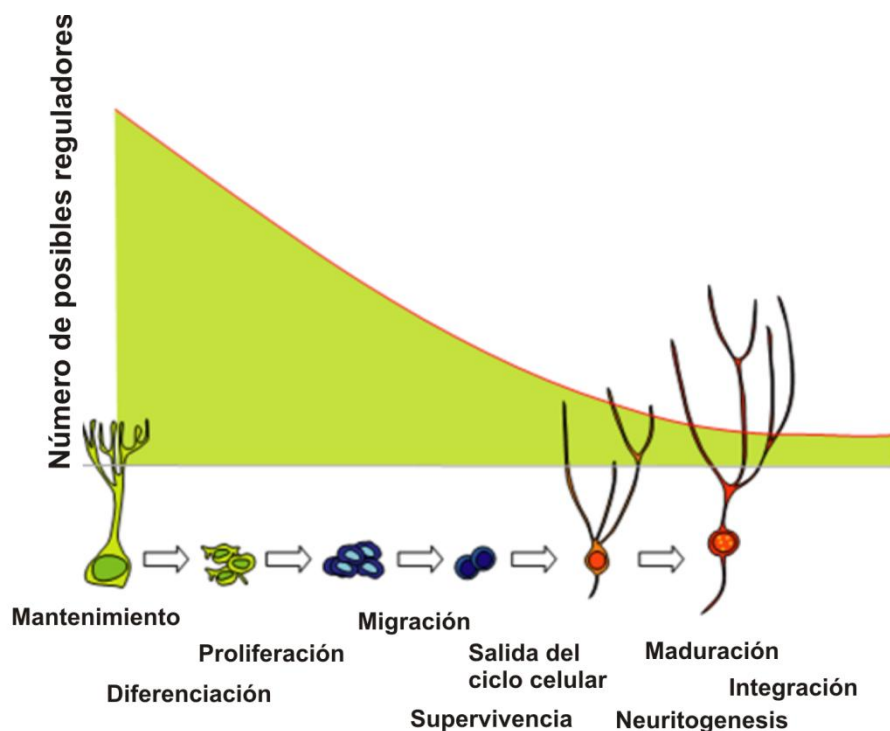


Figura 6. Etapas de la neurogénesis adulta susceptibles de regulación. En el transcurso del desarrollo neural, existe una gran influencia de los acontecimientos reguladores sobre las etapas iniciales, lo cual limita la gama de regulación sobre etapas posteriores. *Modificado de Kempermann, 2011b.*

FACTORES INTERNOS:

- Genéticos y moleculares.

La neurogénesis adulta comparte con la neurogénesis embrionaria los perfiles de expresión génica (Ma y col., 2010; Hsieh, 2012; Faigle y Song, 2013). Así, genes que inducen neurogénesis y morfogénesis embrionaria, como los genes *Notch*, *BMP* (del inglés “bone morphogenetic protein”, proteína morfogénica ósea), *Eph/ephrins* (efrinas), *Noggin* y *Shh* (del inglés “sonic hedgehog”),

también regulan la proliferación y la diferenciación celular en el cerebro adulto (Álvarez-Buylla y Lim, 2004).

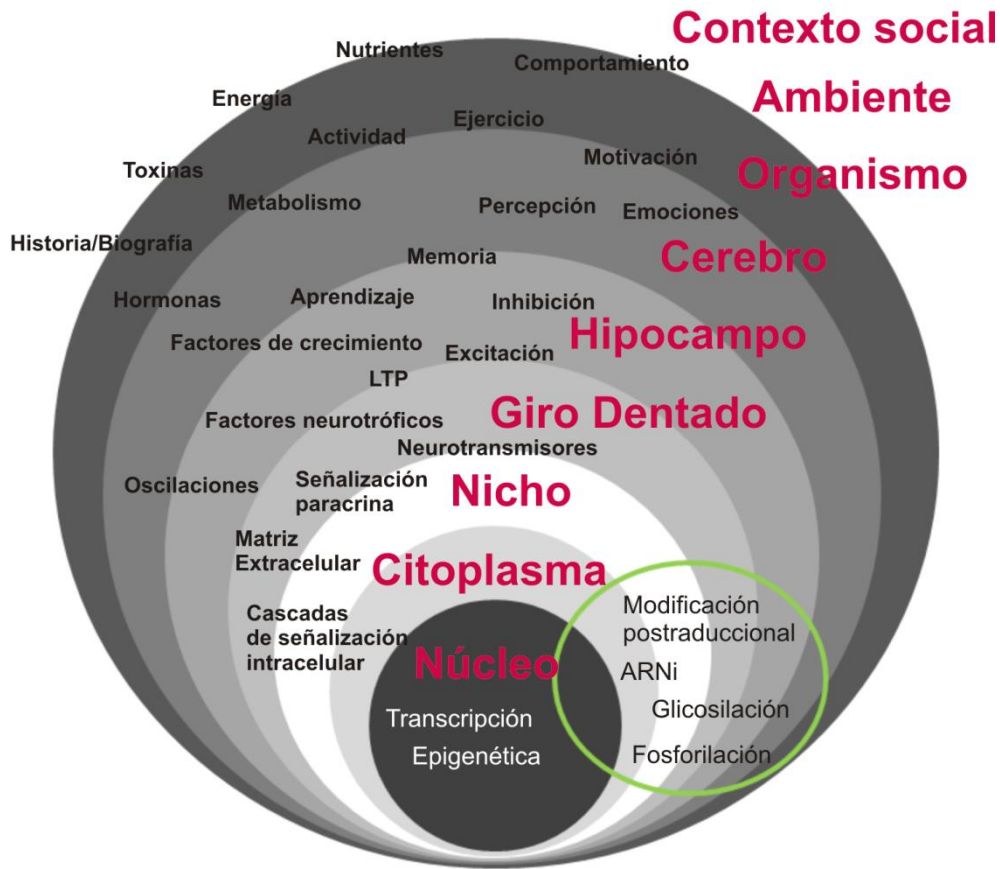


Figura 7. Factores que regulan la neurogénesis adulta. Existen numerosos factores reguladores a todos los niveles del proceso de neurogénesis, desde los genes hasta el contexto social. En esta representación jerárquica en forma de capas se muestra la complejidad de reguladores, que incluso pueden participar en varios niveles. *Modificado de Kempermann, 2011b.*

- Factores de crecimiento.

La expresión de diversos factores de crecimiento, como BDNF (del inglés “brain-derived neurotrophic factor”, factor neurotrófico derivado del cerebro), IGF-1 (del inglés “insulin-like growth factor 1”, factor de crecimiento insulínico tipo1), FGF-2 (del inglés “fibroblast growth factor 2”, factor de crecimiento fibroblástico tipo2), EGF (del inglés “epidermal growth factor”, factor de crecimiento epidérmico) o VEGF (del inglés “vascular endothelial growth factor”, factor de crecimiento endotelial vascular), implicados en la regulación del destino celular, puede determinar el tamaño de la población neuronal o glial, tanto en cerebros en desarrollo como adulto (Pérez-Domper y col., 2013). Diferentes estudios concluyen que estos factores, en general, estimulan la

neurogénesis adulta (Kuhn y col., 1997; Lee y col., 2002a; Aberg y col., 2003; Rai y col., 2007; Cao y col., 2004).

- Neurotransmisores.

La neurogénesis adulta también se modula por diversos neurotransmisores. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia y su función está mediado por varios tipos de receptores iónicos [receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y de kainato] y metabotrópicos. La neurotransmisión glutamatérgica tiene efectos duales sobre la neurogénesis adulta. Por un lado, tiene un efecto inhibitorio de la proliferación celular. Así, se ha demostrado que la lesión de la corteza entorrinal (Cameron y col., 1995), la mayor vía de entrada glutamatérgica del hipocampo, y que el bloqueo farmacológico de los receptores de NMDA (Gould y col., 1994; Nacher y col., 2001) o metabotrópicos (Yoshimizu y Chaki, 2004), incrementan la neurogénesis. Por otro lado, la activación de receptores de glutamato tipo kainato y AMPA aumentan la proliferación celular (Parent y col., 1997; Bai y col., 2003). Por tanto, la transmisión glutamatérgica ejerce un fino control sobre la neurogénesis adulta.

La innervación colinérgica promueve la supervivencia celular. De este modo, la disminución de esta innervación produce una reducción de la neurogénesis adulta y aumenta el número de células apoptóticas (Cooper-Kuhn y col., 2004).

También ha sido descrito que la deficiencia en serotonina (Brezun y Daszuta, 1999; Gould, 1999), noradrenalina/norepinefrina (Kulkarni y col., 2002) y dopamina (Höglinger y col., 2004) reducen la tasa de proliferación neurogénica. Por lo tanto, la innervación serotoninérgica, noradrenérgica y dopaminérgica incrementa la neurogénesis adulta.

- Hormonas.

La principal hormona reguladora de la neurogénesis adulta son los corticoesteroides. Estas hormonas juegan un papel importante en la reducción de la neurogénesis adulta durante el envejecimiento (Cameron y McKay, 1999) o en respuesta al estrés (Gould y col., 1992; Cameron y Gould, 1994). Sin embargo, los niveles hormonales no siempre correlacionan con los efectos en neurogénesis adulta, pudiéndose dar el caso de situaciones fisiológicas con altos niveles de corticoesteroides asociados a un incremento de la neurogénesis (Kempermann, 2011a). Por otro lado, los esteroides ováricos y los estrógenos endógenos tienen un efecto estimulante en la proliferación de los precursores granulares (Tanapat y col., 1999; Ormerod y Galea, 2001).

- Edad.

La edad disminuye la neurogénesis adulta en prácticamente todas las especies (Seki y Arai, 1995; Kuhn y col., 1996). La edad provoca una reducción significativa en proliferación celular, supervivencia y diferenciación neuronal. El descenso de la neurogénesis adulta con la edad no es total y, a pesar de tratarse de niveles muy bajos, puede ser detectada en avanzada edad, incluso en humanos, donde el descenso no es tan pronunciado y no llega a desaparecer (Eriksson y col., 1998) (**Fig.8**).

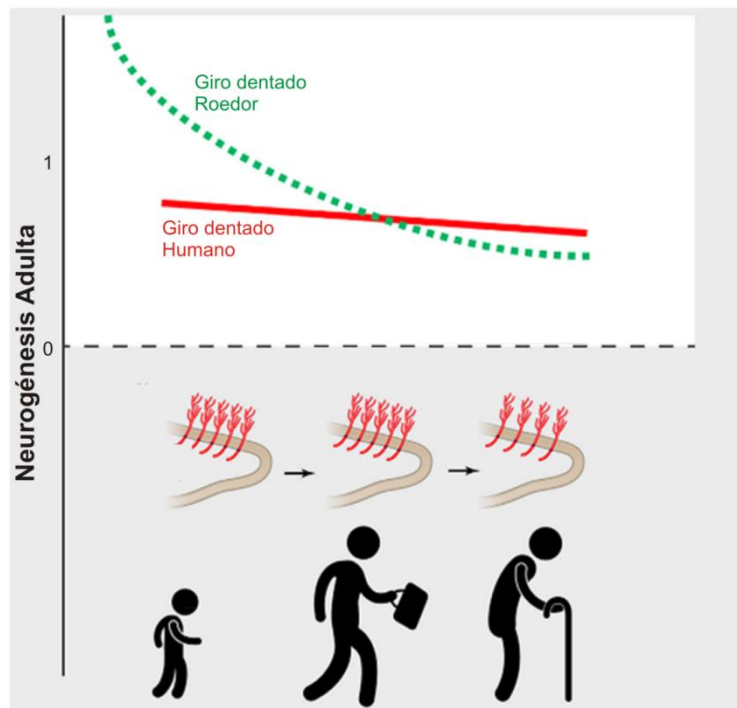


Figura 8. Comparación de la neurogénesis hipocampal adulta en roedores y humanos con respecto a la edad. El hipocampo humano genera nuevas neuronas a un ritmo constante hasta una edad avanzada, sólo muestra una ligera disminución de la tasa de neurogénesis respecto a la edad (línea roja). Por el contrario, en otras especies como los roedores, se parte de una elevada tasa de neurogénesis en edades tempranas que sufre un agudo descenso hasta una avanzada edad (línea verde). La tasa de neurogénesis en seres humanos adultos es comparable a los niveles en roedores de mediana edad (intersección línea roja y verde). *Modificado de Kheirbek y Hen, 2013.*

FACTORES EXTERNOS:

- Ejercicio físico voluntario.

La actividad física actúa como regulador positivo de la neurogénesis adulta en la SGZ (van Praag y col., 2005). La actividad física tiene dos efectos diferentes: uno más agudo, que es transitorio y afecta a la proliferación celular (van Praag y col., 1999; Wu y col., 2008) y otro que es más prolongado en el tiempo, que

afecta al nicho de las células precursoras como un todo, es decir, incrementa la proliferación, la supervivencia y por lo tanto, el número total de nuevas neuronas generadas (Holmes y col., 2004). De hecho, ha sido descrito que el ejercicio físico provoca mejoras en la realización de tareas dependientes de hipocampo.

- Enriquecimiento ambiental.

El enriquecimiento ambiental consiste en exponer a los animales a un ambiente novedoso y cambiante. Este estímulo también es un regulador positivo de la neurogénesis adulta en la SGZ, promoviendo la supervivencia de las nuevas neuronas (Kempermann y col., 1997b; Llorens-Martín y col., 2010). Además, este efecto potenciador es incluso mayor en edades avanzadas (Kempermann y col., 1998; Kempermann y col., 2002). Incluso, el entrenamiento específico con tareas dependientes del hipocampo aumenta la supervivencia de las nuevas neuronas en giro dentado (Gould y col., 1999b).

- Estrés.

Vivir en condiciones de estrés regula negativamente la neurogénesis hipocampal adulta. Situaciones de estrés crónico, alteran el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, provocando un aumento de los niveles de glucocorticoides circulantes. El aumento de glucocorticoides reduce la proliferación celular en la SGZ (Gould y col., 1998; Pham y col., 2003; Mirescu y Gould, 2006).

- Inflamación.

La respuesta inflamatoria puede ser producida por respuesta a diversos daños o neurodegeneración. La inflamación disminuye la capacidad proliferativa y el destino neuronal de los progenitores (Carpentier y Palmer, 2009). Además, podría alterar el nicho neurogénico con angiogénesis aberrante y activación microglial (Monje y col., 2003).

- Dieta.

La alimentación puede influenciar el proceso de neurogénesis adulta (Park y Lee, 2011). Estudios en restricción calórica han mostrado un aumento de la proliferación celular en el giro dentado (Lee y col., 2000 y 2002b). Por el contrario, la obesidad por una dieta alta en grasas actúa negativamente sobre la neurogénesis hipocampal adulta (Lindqvist y col., 2006; Tozuka y col., 2009). Además, se ha demostrado que los ácidos grasos omega III (Kawakita y col., 2006) aumentan la neurogénesis adulta, mientras la vitamina E (Ciaroni y col., 2002; Ferri y col., 2003) o la cafeína (Wentz y Magavi, 2009), la disminuyen.

- Estados patológicos.

Estados patológicos, como la epilepsia o la isquemia, producen alteraciones en el proceso de neurogénesis adulta (Kuhn y col., 2001). Por un lado, los ataques epilépticos aumentan la proliferación celular en el GD (Bengzon y col., 1997; Madsen y col., 2000; Kron y col., 2010) y producen errores de migración con localizaciones ectópicas (Parent y col., 1997). Por otro lado, la isquemia es un inductor de proliferación y migración a la zona dañada, aunque la mayoría de las nuevas neuronas mueren por no establecer contactos sinápticos funcionales (Takagi y col., 1999; Arvidsson y col., 2002).

- Drogas de abuso.

La administración de diferentes drogas de abuso, como los opiáceos (Eisch y col., 2000), la nicotina (Abrous y col., 2002) o el alcohol (Herrera y col., 2003), tiene un efecto negativo sobre el proceso de neurogénesis hipocampal adulta.

1.6. Perspectiva de la contribución de la neurogénesis hipocampal adulta a los circuitos cerebrales y procesos cognitivos.

En primer lugar, debemos plantearnos ¿qué papel juega el hipocampo en el cerebro adulto? La respuesta a dicha pregunta es relevante a la hora de tratar responder a la siguiente ¿por qué o para qué hay neurogénesis en el hipocampo adulto?

Una de las funciones del hipocampo más aceptada es su papel en memoria espacial (Bingman, 1992). Las primeras evidencias de que el hipocampo provee un mapa de referencia espacial fueron aportadas por los experimentos de O'Keefe en los años 70 (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; O'Keefe, 1976). En estos experimentos implantando multielectrodos en el hipocampo de ratas se describieron células que se activan específicamente cuando el animal ocupa una determinada posición mientras explora un ambiente determinado (células de lugar). Además, posteriormente se ha descrito que la capacidad de poder trazar un mapa físico mental podría facilitar la formación de memoria episódica de los eventos que ocurrieron en cada lugar (Scoville y Milner, 2000; Heckers y col., 2004 y Lehn y col., 2009). El caso clínico más famoso, que pone en evidencia el papel del hipocampo en la adquisición de este tipo de memoria, es el del paciente H.M., quien a falta de gran parte del hipocampo se olvidaba de todos los eventos de su vida diaria pasados unos pocos minutos. La existencia de otros casos clínicos similares consolidó el papel del hipocampo en el procesamiento de memorias recientes. De acuerdo con ello, el hipocampo podría actuar como una zona de convergencia de datos, contribuyendo a su activa asociación. Así, se postula

que el hipocampo podría ser un organizador de representaciones temporales (Eichenbaum y col., 1999; Eichenbaum, 2002) que luego son almacenadas de forma duradera en otras regiones corticales, probablemente aquellas con las que se interrelaciona durante la formación de las mismas (Álvarez y Squire, 1994).

Curiosamente y de acuerdo con la segregación estructural mencionada previamente en secciones anteriores, el hipocampo se diferencia funcionalmente en su eje longitudinal, siendo la región dorso-rostral la más involucrada en el procesamiento espacial y la región ventro-caudal, en el procesamiento de las emociones, especialmente, en los procesos de ansiedad y su control inhibitor del comportamiento o potenciador de memoria (Bast y Feldon, 2003; Bannerman y col., 2004 y 2014; Strange y col., 2014).

En base a esta primera respuesta, abordamos la posible funcionalidad de la neurogénesis hipocampal adulta. Aunque, las implicaciones exactas que tiene el proceso de neurogénesis y reemplazamiento neuronal en las funciones del hipocampo adulto y del cerebro en general, no son del todo bien conocidas y existen controversias. Una serie de estudios establecen una conexión entre neurogénesis y la función que desempeña el hipocampo en aprendizaje y memoria (Barnea y Nottebohm, 1996; Feng y col., 2001; Shors y col., 2001 y 2002; Snyder y col., 2005; Aimone y col., 2006; Winocur y col., 2006; Wiskott y col., 2006; Garthe y col., 2009). De hecho, ha sido demostrado que el aprendizaje en sí mejora la supervivencia de las nuevas neuronas recién generadas en GD (Gould y col., 1999b). La hipótesis más aceptada actualmente, es que las nuevas neuronas generadas se requieren para muchas, pero no todas las tareas que dependen del hipocampo. Entre ellas estarían el aprendizaje espacial, la discriminación de patrones espaciales y el condicionamiento contextual al miedo (Deng y col., 2010).

También es importante el conocimiento del proceso de neurogénesis adulta por su implicación en diversas neuropatologías. La alteración y/o la correcta regulación de la proliferación y maduración de los precursores neuronales, conducen al desarrollo de diversas enfermedades. Por ejemplo, la generación de ciertos tumores cerebrales (Noble y Dietrich, 2004).

Otra enfermedad donde se ve alterada la neurogénesis es en la epilepsia. La inducción de convulsiones epilépticas produce un gran aumento de la neurogénesis adulta, debido a una inducción masiva de proliferación celular (Covolan y col., 2000; Madsen y col., 2000; Nakagawa y col., 2000; Auvergne y col., 2002; Ferland y col., 2002). De hecho, aparecen nuevas neuronas ectópicas, no localizadas en su lugar y que no establecen conexiones correctamente, probablemente debido a que tiene lugar una aceleración del desarrollo que conduce a un fallo en la migración de las nuevas neuronas.

Otras patologías donde la implicación de la neurogénesis está confirmada son la depresión y la esquizofrenia. En cuanto a la depresión, se ha observado que los pacientes presentan atrofia hipocampal y síntomas asociados al incorrecto funcionamiento del mismo. Algunas teorías apuntan que estas alteraciones podrían estar relacionadas con fallos en la neurogénesis adulta de GD (Sheline, 1996; Rajkowska y col., 1999; Santarelli y col., 2003; Duman, 2004). El hecho de que el tratamiento crónico con fármacos antidepresivos revierta o prevenga la reducción de la neurogénesis parece confirmar el papel de la neurogénesis en la depresión (Malberg y cols., 2000). En cuanto a la esquizofrenia, se han encontrado hallazgos similares, un descenso de proliferación de precursores neurales (Reif y col., 2006), que pretende ser contrarrestado por el efecto sobre el proceso de neurogénesis de diferentes antipsicóticos (Wakade y col., 2002).

Finalmente, también se han implicado fallos en la neurogénesis adulta como posible causa de enfermedades neurodegenerativas. En la enfermedad de Parkinson, se ha descrito una reducción de células precursoras en la SGZ del GD, que podría estar provocado por la falta de innervación dopaminérgica en el hipocampo (Höglinger y col., 2004). Por otro lado, ha recibido mucha atención la disfunción de neurogénesis en la enfermedad de Alzheimer (Mu y Gage, 2011; Nicolas y Hassan, 2014; Felsenstein y col., 2014). En cualquier caso, el fallo de neurogénesis hipocampal adulta, se traduciría en el deterioro cognitivo que se observa en los pacientes de estas enfermedades.

2. BASES CELULARES Y MOLECULARES DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.

2.1. Conceptos de aprendizaje y memoria. Fases del procesamiento de la información.

El aprendizaje es el proceso a través del cual se adquieren nuevas habilidades, destrezas, conocimientos, conductas o valores como resultado del estudio, la experiencia, la instrucción, el razonamiento y/o la observación (Kandel, 2001). Así, los organismos modifican su conducta para adaptarse a las condiciones cambiantes e impredecibles del entorno que los rodea. Junto a las fuerzas selectivas de la evolución, el aprendizaje constituye el modo principal de adaptación de los seres vivos.

Además, se distinguen diversos tipos de aprendizaje (Kandel, 2001; Sweatt, 2003) (**Fig.9**):

- Perceptivo: identificación de objetos y situaciones, habituación y sensibilización.
- Estímulo-respuesta: condicionamiento clásico (asociación entre dos estímulos) y aprendizaje operante o instrumental (asociación entre comportamiento y consecuencia).
- Motor: adquisición de secuencias de movimientos para llevar a cabo una tarea de modo prácticamente automático. Aunque algunos autores lo consideran como una forma de aprendizaje estímulo-respuesta.
- Relacional: evaluaciones, comparaciones e inferencias conscientes entre informaciones diversas.

El aprendizaje y la memoria son dos procesos estrechamente ligados y en cierto modo coincidentes, como las dos caras de una misma moneda. Solo podemos determinar si alguien ha aprendido algo, observando si más tarde lo recuerda; y solo podemos recordar un episodio, si almacenamos información. Así, por definición, no hay aprendizaje sin memoria ni memoria sin aprendizaje. Imaginemos que nació sin capacidad para formar recuerdos, nada de cuanto experimentásemos dejaría huella. Así pues, la memoria define lo que cada uno de nosotros somos y da a nuestra vida un sentido de continuidad (Eichenbaum, 2002).

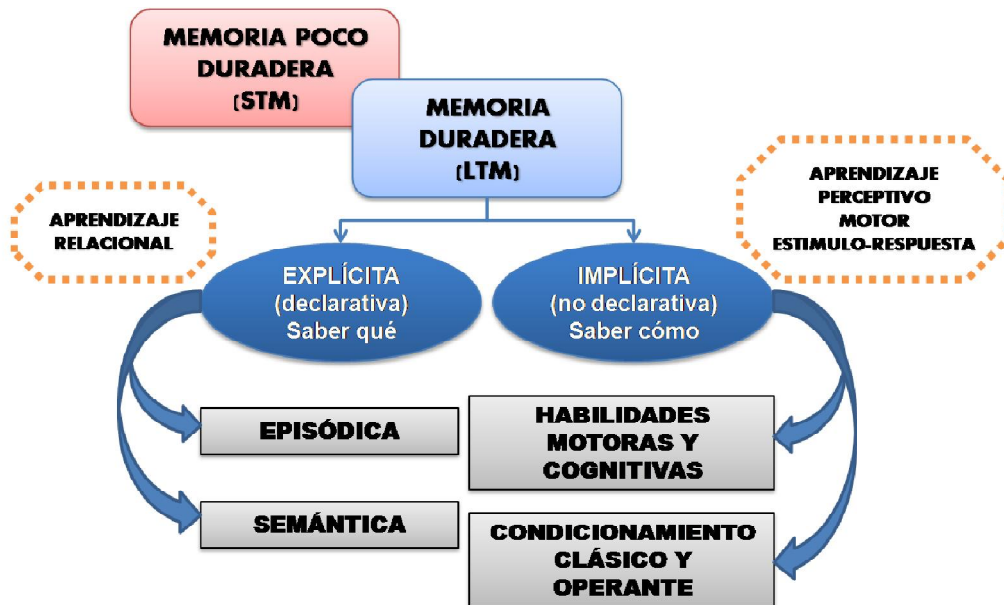


Figura 9. Esquema representativo de los tipos de memoria en relación a los tipos de aprendizaje.

La memoria es un proceso cognitivo que permite al organismo codificar, almacenar y recuperar información. Surge como resultado de la activación repetida de las conexiones sinápticas entre neuronas. De hecho, se postula que no existe un lugar físico para la memoria en el cerebro, si no que se encuentra diseminada por distintas localizaciones especializadas. Dado que existe un flujo de la información a su paso por el cerebro, el proceso de formación de la memoria incluye al menos dos estadios: memoria poco duradera y memoria duradera. La memoria poco duradera (STM, del inglés “short-term memory”) es un sistema para almacenar una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo (segundos a horas). Es una memoria inmediata para los estímulos que acaban de ser percibidos, frágil y transitoria que enseguida se desvanece y que resulta muy vulnerable a cualquier tipo de interferencia. Se basa en actividad o cambios efímeros, eléctricos o moleculares, en las neuronas que procesan la información. Por otro lado, la memoria duradera (LTM, del inglés “long-term memory”) es un sistema para almacenar una gran cantidad de información durante un tiempo indefinido (días a años). A diferencia de la memoria poco duradera, es una memoria estable, muy poco vulnerable a las interferencias. Se basa en la activación de mecanismos de plasticidad neuronal produciendo cambios estructurales, eléctricos y/o moleculares en las conexiones entre neuronas. Gracias a esta memoria poseemos recuerdos permanentes principalmente bajo dos categorías (Eichembaum, 2002; Morgado, 2005) (**Fig.9**):

- Explícita o declarativa: aprendemos qué es el mundo, adquiriendo información sobre nombres y hechos, que constituye la memoria semántica, y acontecimientos personales vividos, memoria episódica.
- Implícita o no declarativa: aprendemos cómo se hacen las cosas, adquiriendo habilidades motoras y cognitivas y condicionamiento clásico y operante.

En el procesamiento de la información es posible diferenciar diversas fases (Kandel, 2001; Eichenbaum 2002; Morgado, 2005) (**Fig.10**):

- Adquisición, también llamada codificación o registro. Consiste en la recepción, procesamiento y combinación de la información recibida. Así, formamos un código para su representación. Es el paso inicial de la formación de la memoria poco duradera (STM). Supone una excitación de la sinapsis para reforzarla o sensibilizarla transitoriamente.
- Consolidación o almacenamiento duradero de la información codificada. La formación de una memoria permanente (LTM) requiere la conversión de memorias limitadas y lábiles (STM) en una traza duradera (Hebb, 1949). Supone un reforzamiento permanente de la sinapsis, estructural y funcionalmente (Davis y Squire, 1984; Goelet y col., 1986; McGaugh, 2000), gracias a la transcripción de ciertos genes y a la síntesis de las proteínas correspondientes (Abel y Kandel, 1998; Abel y Lattal, 2001; Milner y col., 1998). Bajo el término de consolidación se hace referencia a dos tipos de procesos: consolidación sináptica y la consolidación sistémica. La consolidación sináptica comprende los cambios que ocurren poco tiempo después (segundos a horas) del aprendizaje en las sinapsis implicadas en el mismo. Requiere la comunicación entre la sinapsis, cuerpo celular y núcleo (Dudai y Morris, 2000), produciéndose cambios en la eficiencia sináptica de regiones específicas asociadas a la adquisición de la información (Dudai, 2004). Por otro lado, la consolidación sistémica ocurre más lentamente y su resultado es más duradero, desde semanas hasta años. Requiere de la redistribución de la información almacenada, mediante procesos de comunicación neuronal, en nuevos circuitos o sistemas cerebrales que codifican la memoria, para que sean accesibles a su utilización (Laroche y col., 2000; Dudai, 2004; Preston y Eichenbaum, 2013).
- Recuperación o recuerdo. Supone obtener la información almacenada en respuesta a una señal o estímulo para su utilización en un proceso o actividad.

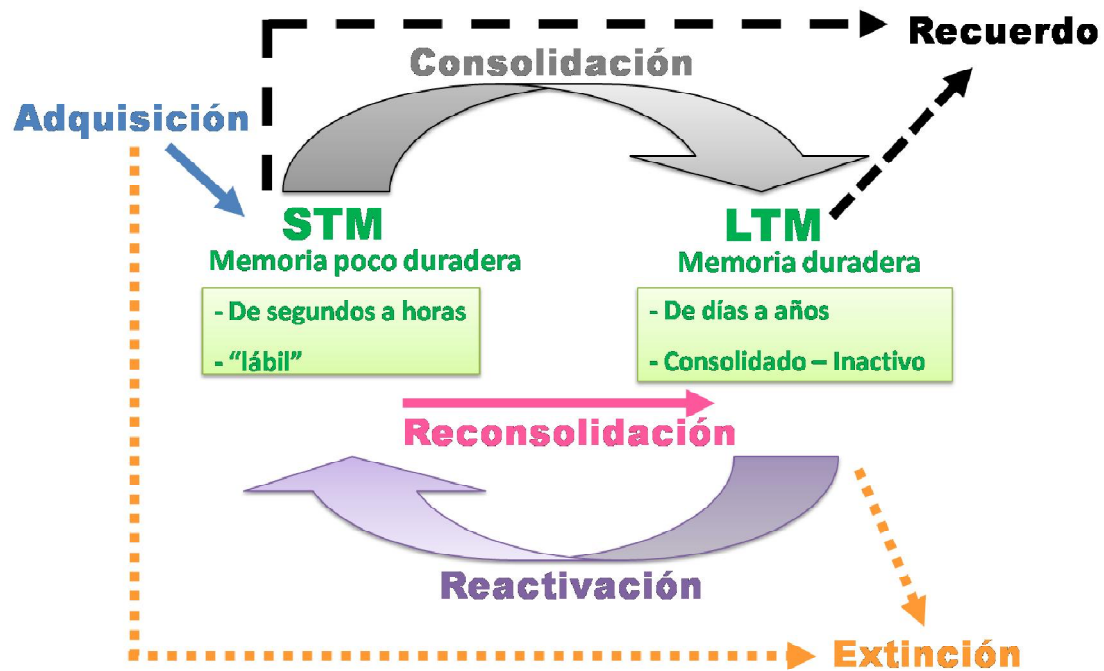


Figura 10. Esquema representativo de las fases del procesamiento de información.

- **Reactivación.** Proceso de reexposición a los estímulos o señales implicados en un anterior proceso de consolidación. Supone la activación de nuevas conexiones neuronales que no estaban funcionales en las primeras fases del anterior proceso de aprendizaje y consolidación correspondientes.
- **Reconsolidación.** Reforzar o crear una nueva memoria permanente a partir de una memoria ya consolidada. Cuando una memoria ya consolidada se reactiva, requiere de un nuevo proceso de consolidación para que persista (Przybylski y Sara, 1997; Przybylski y col., 1999; Nader y col., 2000a y 2000b). Se vuelve nuevamente lábil (memoria poco duradera, STM) (Dudai, 2006; Nader y Hardt, 2009; Hardt y col., 2010) con la capacidad de ser alterada si en ese momento se introduce nueva información o algún tratamiento específico (Misanin y col., 1968; Sara, 2000; Extón-McGuinness y col., 2015).

Aunque ambos procesos, consolidación y reconsolidación, sugieren una naturaleza celular y molecular similar, de hecho ambas dependen de síntesis de nuevas moléculas, éstas no son las mismas para ambos ni las áreas cerebrales implicadas (Dudai, 2004; Lee y col., 2004; Romero-Granados y col., 2009).

- Extinción. Cuando los estímulos de recuerdo se presentan repetidamente en otro contexto o asociado a otros elementos, puede iniciarse un proceso en el que un nuevo aprendizaje hace que pierda relevancia la respuesta anteriormente aprendida.

2.2. Paradigmas cognitivos que dependen del hipocampo.

El aprendizaje y la memoria son fundamentales para la vida cotidiana y en ellos, tiene un papel muy relevante el hipocampo. Su estudio requiere del desarrollo y uso de sistemas experimentales y paradigmas cognitivos para caracterizar los mecanismos subyacentes a dichos procesos (Sweatt, 2003). Centrándonos en el sistema experimental de roedores y aprovechando sus conductas innatas, analizamos en profundidad los paradigmas que dependen del hipocampo utilizados en este trabajo:

1. Reconocimiento de objetos.

El paradigma de reconocimiento de objetos se considera un aprendizaje perceptivo, basado en la preferencia innata del roedor por explorar lo novedoso, es decir, que no tiene un significado natural para el animal y no se encuentra asociado a un estímulo de aversión o refuerzo. Los roedores muestran esta preferencia mediante un mayor acercamiento, olfateo, manipulación y elevación sobre los objetos nuevos en contraposición de los familiares (Aggleton, 1985). Estos parámetros pueden ser cuantificados con facilidad y permiten estudiar, en función de la complejidad del diseño experimental, desde una memoria estricta y simple de reconocimiento, hasta memoria espacial compleja, temporal y episódica. Además, dado que se evalúa comportamiento espontáneo de los roedores, es una buena aproximación a las condiciones en las cuales se evalúa la memoria de reconocimiento en humanos (Ennaceur y Delacour, 1988).

En este paradigma de aprendizaje y memoria participan activamente las cortezas sensoriales (visual, olfativa y somatosensorial), puesto que son las primeras en captar la información del entorno y codificarla antes de ser enviada a otras regiones neocorticales. Así, cabe destacar también el lóbulo temporal medial que procesa la información para su almacenamiento. En esta área cerebral se encuentran una serie de regiones que juegan un papel importante en el reconocimiento de objetos: el hipocampo, la corteza entorrinal y las cortezas parahipocampales (perirrinal y postririnal) (Buffalo y col., 1999; Squire y col., 2004; Eichenbaum y col., 2007), puesto que son requeridas en la integración de los componentes de dicha memoria: quién, qué, dónde y cuándo (Clayton y Dickinson, 1998; Ergorul y Eichenbaum, 2004; Eichenbaum y Fortin, 2005). Todas estas regiones se encuentran en comunicación, de modo que el hipocampo tiene conexiones directas e indirectas con las cortezas

parahipocampales a través de la corteza entorrinal (Witter y col., 1986; Dickerson y Eichenbaum, 2010; Deshmukh y Knierim, 2011).

Por lo tanto, en cuanto al principal flujo de información de reconocimiento por estas regiones ("qué" y "dónde"), podemos decir que la mayoría de la entrada neocortical a la corteza perirrinal proviene de áreas de asociación que procesan la información sensorial unimodal acerca de las cualidades de los objetos (el componente "qué"), mientras que la mayor parte de la entrada neocortical a la corteza postrinal, proviene de áreas que procesan la información polimodal espacial (el componente "dónde") (Suzuki y Amaral, 1994; Burwell y col., 1995). Aunque hay conexiones entre ambas, las corrientes de procesamiento "qué" y "dónde" se mantienen segregadas anatómicamente en la corteza entorrinal. Así, la corteza perirrinal (CPR) conecta principalmente con la corteza entorrinal lateral (CEL), mientras que la corteza postrinal (CPH), con la corteza entorrinal medial (CEM). Toda esta información converge en el hipocampo, lo cual sugiere su participación como sistema para asociar y categorizar estas variables aisladas (Brown y Aggleton, 2001) (Fig.11).

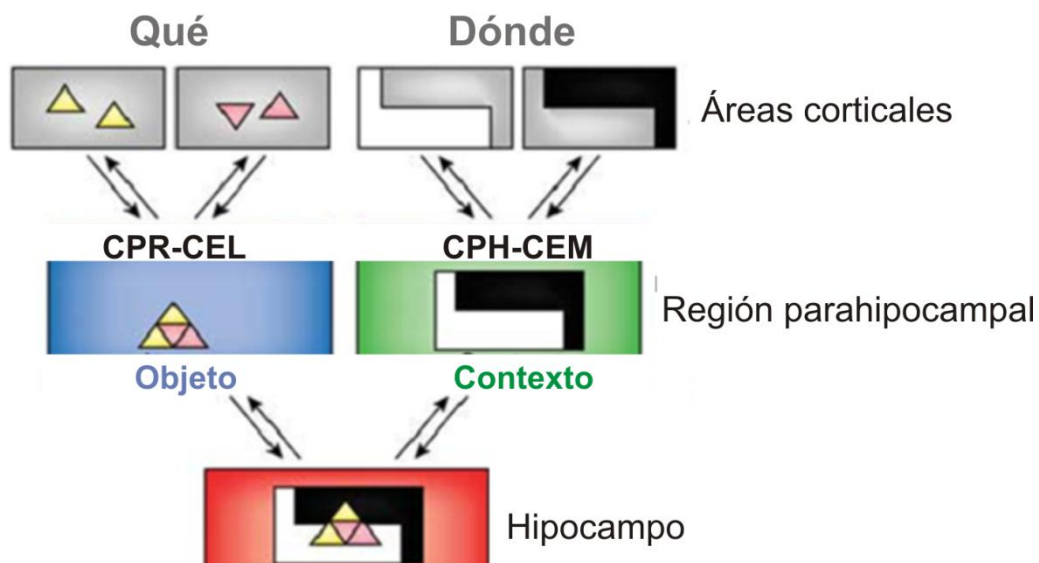


Figura 11. Esquema de la organización funcional propuesta para el sistema de memoria de reconocimiento del lóbulo temporal medial. La entrada neocortical respecto a las características del objeto ("qué") converge en la corteza perrinal (CPR) y la corteza entorrinal lateral (CEL), mientras que los detalles sobre la ubicación de objetos ("dónde") convergen en la corteza postrinal (CPH) y la corteza entorrinal medial. Estas corrientes de información convergen en el hipocampo, en el cual se genera una representación de los mismos. La comunicación, como indican las flechas, son bidireccionales. Las proyecciones inversas pueden registrar el recuerdo a la asociación de los objetos o a los elementos contextuales respectivamente. *Modificado de Dickerson y Eichenbaum, 2010.*

2. Evitación pasiva.

La evitación pasiva, como una forma de condicionamiento al miedo, es uno de los paradigmas más potentes para el estudio de los sustratos neuronales del aprendizaje asociativo y los mecanismos de formación de este tipo de memoria en el cerebro de mamíferos (Davis, 2000; LeDoux, 2000; Fanselow y Poulos, 2005). En este paradigma se expone al sujeto de estudio a un estímulo aversivo, tal como un choque eléctrico en las patas, en un determinado contexto y junto con un estímulo neutral, como la apertura de una puerta y/o estimulación luminosa. Como resultado del entrenamiento, el estímulo neutro adquiere propiedades aversivas y cuando se presentan solos en las sesiones de evaluación de la memoria, provoca una respuesta de miedo. En roedores, tales respuestas suponen comportamientos de parálisis, temblores, alteraciones de la actividad del sistema nervioso autónomo, liberación de hormonas relacionadas con el estrés, analgesia y facilitación de los reflejos.

La amígdala es una de las estructuras del cerebro clave para la adquisición y almacenamiento de la memoria aversiva (Davis, 2000; LeDoux, 2000; Maren, 2001; Fanselow y Poulos, 2005). Además, también modula este tipo de aprendizaje en relación con otras estructuras, como el hipocampo y la corteza (McGaugh, 2004). De hecho, en general, se ha podido comprobar que el estado emocional y motivacional, en lo cual está implicado la amígdala, es decisivo para la consolidación de la memoria (Aggleton, 1993).

En cuanto al flujo de la información, la amígdala es un lugar de convergencia sensorial (visual auditiva, olfativa-gustativa, somatosensorial, contextual), desde el tálamo, la formación hipocampal y la corteza (Turner y Herkenham, 1991; McDonald, 1998). Por otro lado, de la amígdala sale información hacia diferentes estructuras del tronco cerebral y el hipotálamo, que median las respuestas de miedo como la congelación, sobresalto, aumento de frecuencia cardíaca y presión arterial, aumento de la respiración, y liberación de glucocorticoides, orquestándose así las respuestas motoras y autónomas condicionadas (Krettek y Price, 1978; Veening y col., 1984; LeDoux y col., 1988; Petrovich y Swanson, 1997) (**Fig.12**).

Se piensa que la amígdala y el hipocampo son los componentes críticos del circuito neuronal subyacente a la formación de la asociación de estímulos (neutro-aversivo) y al procesamiento del contexto (Maren, 2001). Además, la amígdala se encuentra conectada unidireccional o recíprocamente a muchas estructuras corticales y subcorticales del cerebro, con las cuales participa en la generación de respuestas conductuales (McDonald, 1991; McDonald y col., 1996; Pitkänen, 2000). Todo esto sugiere que la información puede ser procesada por los mecanismos intrínsecos de la amígdala (circuitos excitadores e inhibidores), así como modificada por las interacciones con otras

estructuras cerebrales para integrar estímulos sensoriales y generar y modular respuestas aversivas según las circunstancias (Pitkänen y col., 1997; Sah y col., 2003).

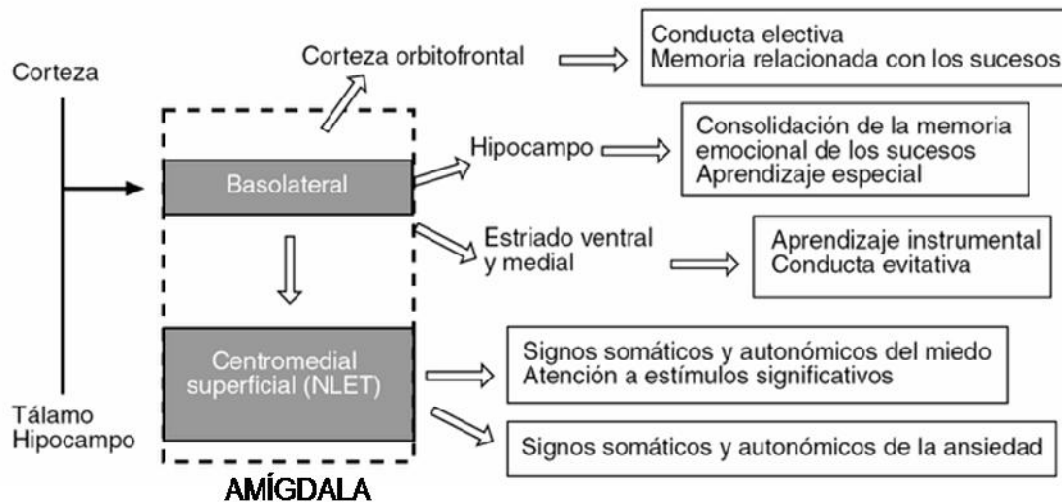


Figura 12. Esquema de la organización funcional para el sistema de memoria aversiva. Principales divisiones de la amígdala, aferencias, eferencias y acciones. *Modificado de Sah y col., 2003.*

2.3. Plasticidad neuronal.

Como consecuencia de la experiencia y el entorno, el sistema nervioso puede modificar su estructura y su condición basal de funcionamiento (Wiesel y Huber, 1963; Wiesel, 1982). Así, la plasticidad neuronal consiste en la capacidad de las neuronas para modificar sus propiedades celulares y la conectividad con otras neuronas. El resultado de estos cambios es una adecuación del organismo al entorno donde vive (Kolb, 1999).

A nivel celular, la plasticidad conlleva modificaciones de las propiedades electrofisiológicas, estructurales y moleculares de las neuronas, que se activan específicamente por un determinado estímulo. Por otro lado, en cuanto a la conectividad con otras neuronas, la sinapsis no es una estructura rígida sino que puede variar a causa de los patrones de actividad cerebral. En muchas sinapsis una actividad repetitiva puede conducir no sólo a una alteración transitoria, sino a modificaciones duraderas e incluso permanentes. Estas alteraciones abarcan un amplio abanico de eventos que incluyen desde la activación de receptores de membrana hasta cambios de expresión génica, pasando por modificaciones post-traduccionales, cambios de localización de moléculas, etc. Todos estos cambios promueven el remodelado y el desarrollo sináptico necesarios para la plasticidad neuronal (Dudai, 2002).

Así, los procesos de aprendizaje y memoria son un reflejo de la plasticidad neuronal. Se piensa que la adquisición de nueva información se encuentra asociada a cambios transitorios de la eficiencia sináptica; mientras que, el almacenamiento de memoria duradera se encontraría ligado a cambios duraderos de eficiencia sináptica y a la modulación de expresión génica que puede culminar en el remodelado sináptico (Goelet y col., 1986; Guzowsky y col., 2001; Dudai, 2004; Inda y col., 2005).

2.3.1. Circuito sináptico del hipocampo.

Como se comentó en apartados anteriores, en el hipocampo distinguimos: giro dentado (GD), el cuerno de amón con sus distintas áreas (CA) y el subículo. La corteza entorrinal adyacente es la fuente de la mayoría de aferencias que recibe el hipocampo, que a su vez recibe información de las cortezas asociativas, parahipocampal y perirrinal.

En cuanto a las conexiones entre regiones, éstas son principalmente unidireccionales, estableciéndose un flujo de información en bucle cerrado que se origina en la corteza entorrinal (**Fig.13**). Las células granulares del GD reciben aferencias de la corteza entorrinal sobre las dendritas apicales en la capa molecular (vía perforante, lateral (LPP, del inglés “lateral perforant pathway”) y medial (MPP, del inglés “medial perforant pathway”). Los axones altamente ramificados de las células granulares, conocidos como fibras musgosas (“mossy fibers”), abandonan el GD a través del *hilus* y se extienden hasta establecer sinapsis espino-dendríticas complejas con las células piramidales de CA3. En el borde interno de la capa granular de GD también se localizan células en cesto, capaces de inhibir simultáneamente un elevado número de células granulares. En la capa molecular de GD y en el *hilus* también se encuentran varios subtipos de interneuronas GABAérgicas. Todas estas células inhibitoras en su conjunto modulan la actividad eferente excitadora de las células granulares de GD. De hecho, las propias células granulares establecen conexiones con células musgosas (“mossy cells”) e interneuronas del *hilus*, las cuales envían proyecciones excitadoras e inhidoras, respectivamente, de vuelta a las mismas.

A su vez, los axones de las neuronas piramidales de CA3 se bifurcan y proyectan a otras neuronas de CA3 recurrentes o del hipocampo contralateral a través de las fibras comisurales, y a las dendritas apicales de CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Los axones de CA1 proyectan, ya sea a través del subículo o directamente, la información de vuelta a la corteza entorrinal, pero a neuronas de distintas capas de las que partió la vía perforante. En la capa piramidal y su entorno se encuentran la mayoría de las células en cesto y candelabro, interneuronas inhibitoras GABAérgicas implicadas en la

modulación de la actividad eferente glutamatergica excitadora de las células piramidales (Ramón y Cajal, 1905).

Aunque la vía perforante es la aferencia principal a la formación del hipocampo, existen otras vías directas de entrada de información desde la corteza entorrinal, una a las dendritas apicales de CA3 (vía perforante) y otra a las dendritas basales de CA1 (vía temporoamónica). En este circuito simplificado, no podemos olvidarnos que en todo caso se establecen sinapsis entre las células principales y las interneuronas inhibitorias y las sinapsis asociativas entre las células principales.

Así, la formación del hipocampo presenta una gran complejidad estructural y funcional.

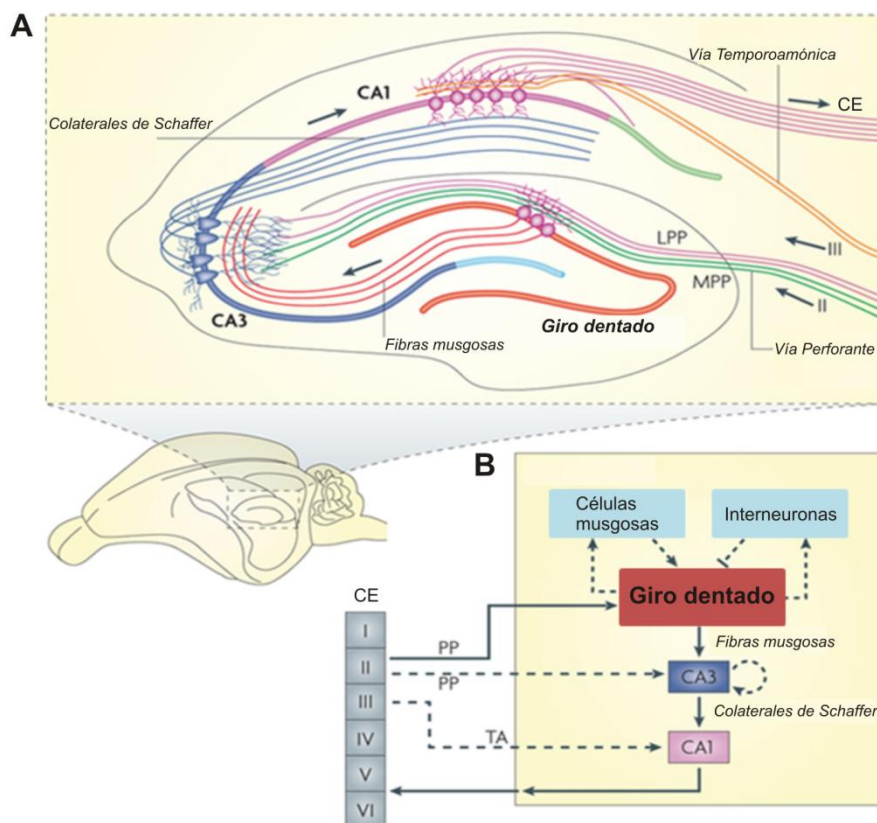


Figura 13. Circuito hipocampal en el cerebro adulto de ratón. A, Ilustración del flujo de información a través de las diferentes vías sinápticas que conectan al hipocampo y la corteza entorrinal (CE). **B,** Esquema simplificado del circuito trisináptico hipocampal en conexión con la corteza entorrinal. Los axones de las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal proyectan hacia las células granulares de GD a través de la vía perforante (PP), distinguiendo entre medial (MPP) y lateral (LPP) según el nivel del GD al que se establece el contacto. A su vez, el GD envía sus proyecciones a las neuronas piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas y éste a las neuronas piramidales de CA1 por medio de las colaterales de Schaffer. Finalmente, desde CA1 se establecen conexiones de vuelta a la corteza entorrinal, aunque a capas más profundas. Además, CA3 recibe proyecciones directas de las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal a través de la vía perforante y CA1 de la capa III a través de la vía temporoamónica (TA). Las células granulares del GD también contactan con células musgosas e interneuronas del *hilus*, las cuales envían proyecciones excitadoras e inhibitorias, respectivamente, hacia las células granulares de GD. *Modificado Deng y col., 2010.*

2.3.2. Eficiencia sináptica.

Los cambios de eficiencia de una sinapsis, transmitiendo un potencial de acción desde la célula presináptica a la postsináptica, tienen una gran relevancia en la plasticidad sináptica, que parece jugar un importante papel en los procesos de aprendizaje y memoria (Martin y col., 2000). El fenómeno más estudiado asociado a cambios de eficiencia sináptica es la potenciación sináptica duradera (LTP, del inglés “long-term potentiation”). La LTP se expresa como un aumento persistente de la transmisión sináptica tras estimular una vía aferente con pulsos de corriente eléctrica de alta frecuencia o tetanizantes (HFS, del inglés “high frequency stimulation”). Este cambio de eficiencia sináptica puede persistir desde horas a días o semanas.

La LTP se describió por primera vez en 1973 por Bliss y Lomo en el hipocampo de conejos anestesiados (Bliss y Lomo, 1973; Bliss y Collingridge, 1993). En sus experimentos observaron que la estimulación de la vía perforante con una serie de estímulos eléctricos daba lugar a la potenciación de los potenciales de campo resultantes. Desde este primer hallazgo, la LTP ha sido estudiada en numerosas especies de vertebrados, incluyendo incluso a primates no humanos (Urban y col., 1996) y humanos (Beck y col., 2000; Cooke y Bliss, 2006). La LTP ha sido estudiada principalmente en el hipocampo, donde ocurre en múltiples regiones del circuito hipocampal: en las principales proyecciones hipocámpales, en las proyecciones directas a CA3 (Do y col., 2002) y CA1 (Colbert y Levy, 1993), y de CA1 a subículo (O'Mara y col., 2000). Sin embargo, la LTP ocurre en otras muchas regiones del cerebro, como cerebelo, amígdala, corteza sensorial, corteza motora o corteza prefrontal (Castro-Alamancos y col., 1995; Blond y col., 2002; D'Angelo y col., 2005; Sigurdsson y col., 2007).

Un principio básico durante las últimas décadas es que la LTP, o al menos el incremento en la eficiencia sináptica duradera, podría ser el correlato celular que subyace a determinadas formas de aprendizaje (Daoudal y Debanne, 2003; Gruart y col., 2006). Esta hipótesis se sustenta en diversas evidencias como que el tratamiento con fármacos que bloquean LTP *in vitro* (Roman y col., 1999; Martin, 2000) o el incremento de la eficiencia sináptica durante el aprendizaje (Gruart y col., 2006; Gruart y Delgado-García, 2007), impiden la adquisición de la información. Además, comparte las ventanas temporales y las bases moleculares propuestas para las memorias poco duradera (STM) y duradera (LTM). Primero ocurre una fase transitoria, la fase temprana (E-LTP, del inglés Early-LTP”) que dura entre segundos y una hora y que depende de modificaciones de proteínas pre-existentes; y posteriormente, ocurren los mecanismos que estabilizan los cambios sinápticos, probablemente la expresión de nuevas moléculas, produciéndose la fase tardía (L-LTP, del inglés “Late-LTP”), que persiste varias horas (Silva y col., 1998; Kandel, 2001;

Sweatt, 2003; Dudai, 2004; Kelleher y col., 2004; Klann y Dever, 2004; Klann y col., 2004; Inda y col., 2005; Sutton y Schuman, 2006).

Además de la LTP, bajo determinadas condiciones de estimulación también se puede producir una depresión sináptica duradera (LTD, del inglés “long-term depression”) (Dudek y Bear, 1993), lo que indica que las neuronas tienen mecanismos para contrarrestar el fortalecimiento sináptico. Aunque su papel en los procesos de aprendizaje y memoria no está claro.

2.3.3. Expresión génica que depende de actividad neuronal.

La expresión génica es un proceso complejo que incluye: transcripción de la información de un gen codificada en ADN a ARN; procesamiento del ARN y su transporte al citosol; y la traducción de la información contenida en el ARN a proteína. Para que se produzca un cambio de expresión de un determinado gen se requiere de la activación de cascadas de señalización, así como la internalización de la señal al núcleo donde, modificándose la actividad de factores de transcripción y/o el epigenoma, se pondrá en marcha el nuevo programa génico (Wolffe y Hayes, 1999; Dudai, 2002). Hoy en día se conocen cientos de genes que cambian su expresión por cambios de actividad neuronal. Cada uno de ellos muestra un curso temporal y una magnitud de cambio específica (Lin y col., 2008). Estos genes cuya expresión cambia durante los procesos de plasticidad neuronal, podemos encuadrarlos en alguno de los siguientes grupos según su función:

- **Factores de transcripción:** proteínas que regulan la transcripción génica. La función y/o expresión de estos factores de transcripción se ve modificada por cambios en el entorno celular (Alberini, 2009).

Los primeros genes descritos que cambian su expresión por actividad neuronal fueron los factores de transcripción de la familia de fos/jun (Greenberg y col., 1986; Herdegen y Leah, 1998). Se observó que líneas celulares de origen neuronal aumentan rápida y transitoriamente la expresión de c-fos tras exposición a agentes que producen despolarización celular. Posteriormente, se demostró el incremento de la expresión de c-fos en el cerebro en respuesta a una amplia variedad de estímulos fisiológicos (Morgan y col., 1987; Rusak y col., 1990; Anokhin y col., 1991).

El factor de transcripción c-Fos, al igual que otros como c-jun, jun-B y zif-268 (egr-1) son miembros de la familia de genes conocidos como genes de expresión temprana o genes tempranos, caracterizados por una activación rápida (5-15min) en respuesta a un estímulo (Sweatt, 2003). El incremento de expresión de estos genes conduce a sucesivas oleadas de cambios transcripcionales, que desencadena un complejo entramado de expresión. Por ello, han sido muy estudiados durante los procesos de plasticidad

neuronal (Cole y col., 1989; Abraham y col., 1991 y 1993; Knapska y Kaczmarek, 2004).

Además de los factores de transcripción codificados por genes tempranos, han sido descritos otros muchos como por ejemplo CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico, del inglés “cAMP response element binding protein”) (Impey y col., 2004), NF- κ B (factor nuclear kappaB, del inglés “nuclear factor-kappa B”) (Hoffmann y col., 2003) o DREAM (modulador antagonista de DRE, del inglés “downstream-response-element-antagonist modulator”) (Carrión y col., 1999).

- **Proteínas de señalización celular.**

Los procesos de plasticidad sináptica provocan cambios en los niveles de numerosas proteínas de señalización, como fosfatasas y quinasas (Blitzer y col., 1995; Soderling y Derkach, 2000), los cuales en general, salvo algunas excepciones, son reguladores negativos (Mansuy y col., 1998a y 1998b; Blitzer y col., 1998; Genoux y col., 2002) y positivos (Silva y col., 1992a y 1992b; Abel y Kandel, 1998; Sweatt, 2004; Pastalkova y col., 2006) respectivamente de la eficiencia sináptica; proteasas (Huang y col., 1996; Szklarczyk y col., 2002) y neurotrofinas como BDNF (Abraham y col., 1993).

- **Proteínas estructurales.**

Estas proteínas se piensa que contribuyen a la estabilización de los cambios estructurales que se producen en las sinapsis durante los procesos de plasticidad sináptica. Así, la mayor parte de estas proteínas son del citoesqueleto, como Arc (proteína asociada a citoesqueleto regulada por actividad, del inglés “activity-regulated cytoskeletal-associated protein”) (Chowdhury y col., 2006; Rial Verde y col., 2006; Messaoudi y col., 2007), MAP2 y MAP1B (proteína asociada a microtúbulos, del inglés “microtubule-associated protein”) (Hou y Xing, 2006; Davidkova y Carroll, 2007), que podrían contribuir a la estabilización de las sinapsis activadas (Bolshakov y col., 1997; Lüscher y col., 2000). Aunque por otro lado, también se ha observado cambio de expresión de receptores de neurotransmisores, como el receptor de AMPA (AMPA-R) (Nayak y col., 1998).

2.3.4. Remodelado sináptico neuronal

La inducción de actividad neuronal también puede producir un remodelado dendrítico, una vez cesado el crecimiento y desarrollo del árbol dendrítico propio de la neurona (Cline, 2001; Wong y col., 2002; Miller y Kaplan, 2003; Lohmann y Wong, 2005). No está claro el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta regulación de la estructura espino-dendrítica, pero el

aumento de los niveles de Ca^{2+} en la dendrita es un requisito necesario para desencadenar el remodelado dendrítico (Wong y col., 2002; Parrish y col., 2007). Además, las células gliales contribuirían también con la liberación de factores solubles que afectan sobre la estructura dendrítica (Volterra y Meldolesi, 2005; Wang y col., 2006).

De este modo, el remodelado de la arquitectura sináptica también ha sido asociado con los procesos de plasticidad sináptica en el almacenamiento de información (Bailey y Kandel, 1993). Varios estudios muestran evidencias de cambios en cuanto a crecimiento, densidad de espinas (Toni y col., 2001) e incluso de botones sinápticos asociados a LTP (Andersen y Soleng, 1998; Engert y Bonhoeffer, 1999; Toni y col., 2001) o paradigmas *in vivo* de aprendizaje (Andersen y Soleng, 1998; Geinisman y col., 2001).

2. OBJETIVOS

En las últimas dos décadas ha crecido la investigación relativa al proceso de neurogénesis en el animal adulto. A pesar del conocimiento en cuanto a los cambios celulares, moleculares y electrofisiológicos que ocurren durante la maduración de nuevas neuronas en el cerebro adulto, la participación de la neurogénesis hipocampal adulta en el funcionamiento del hipocampo y en los procesos de aprendizaje y formación de la memoria es objeto de un fuerte debate.

Por ello, en este trabajo de investigación realizamos un abordaje experimental para la consecución del siguiente objetivo general:

Establecer la participación de la neurogénesis adulta en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo.

Para desarrollar este objetivo final deberemos de resolver los siguientes objetivos específicos:

a. Desarrollar y caracterizar un protocolo de ablación de la neurogénesis hipocampal adulta, rápido y selectivo, por irradiación con rayos X.

- Determinar los efectos de la irradiación sobre diferentes poblaciones celulares del giro dentado.
- Establecer si el protocolo de ablación de neurogénesis genera efectos no deseados (neuroinflamación, deterioro de neuronas maduras, etc.).

b. Estudiar los efectos de la ablación de la neurogénesis hipocampal adulta sobre la inducción de cambios de la eficiencia sináptica duradera (LTP).

c. Estudiar la dependencia de neurogénesis de las distintas fases del procesamiento de información.

- Establecer el papel de la neurogénesis en el aprendizaje y consolidación de memorias, sin o con componente emocional, empleando como paradigmas: reconocimiento de objetos y evitación pasiva, respectivamente.
- Determinar la influencia de la neurogénesis hipocampal adulta en el proceso de reconsolidación de memorias ya almacenadas empleando como paradigma el reconocimiento de objetos.

d. Estudiar el reclutamiento-activación de neuronas inmaduras y/o maduras por los circuitos hipocampales en distintas fases del procesamiento de información.

- Caracterizar la activación de las diferentes áreas hipocampales en consolidación y reconsolidación.

- Determinar en qué fases del procesamiento de la información se produce la activación de células neurogénicas.
- Determinar si la ablación de la neurogénesis determina el reclutamiento-activación de neuronas maduras durante las distintas fases del establecimiento de memorias.

3. MATERIALES y MÉTODOS

1. Sujetos experimentales.

Ratones machos (*Mus Musculus*, cepa *Swiss*) de entre 5-6 semanas de edad, fueron adquiridos de un distribuidor oficial (Centro de Producción Animal de la Universidad de Sevilla, España o Janvier, Francia). Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a la Legislación de la Unión Europea (2010/63/EU) y española (BOE 67/8509-12, 1988 y BOE 34/11370-421, 2013) vigentes en materia de obtención, transporte, cuidado y manipulación de animales de experimentación y con la aprobación del comité ético de la Universidad Pablo de Olavide. Previamente a la experimentación, los animales fueron habituados durante dos semanas a las condiciones estándar de estabulación (ciclo de 12h luz/oscuridad, temperatura, ventilación y humedad), las cuales son controladas en todo momento. Los ratones permanecieron en jaulas conjuntas (5-6 ratones por jaula) durante todo el periodo de estabulación con acceso libre a comida y agua (alimentación *ad libitum*).

2. Irradiación con rayos X.

La irradiación se llevó a cabo en el animal despierto e inmovilizado en un cilindro de plástico provisto de orificios de respiración en el interior de una caja de transporte con capacidad para 5 animales. La caja de transporte posee un recubrimiento de plomo que protege el cuerpo del animal, mientras deja expuesta únicamente la cabeza de los mismos. La caja de transporte se introdujo en la cabina de irradiación (MBR-1505R, HITACHI; Servicio del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC), Sevilla) (**Fig.14**) y los ratones fueron irradiados a 150kV y 5mA durante 30min (dosis total de irradiación de 10Gy; Intensidad: 0,35Gy/min) y a una distancia de la fuente de irradiación de 13cm. Para descartar el posible efecto de la manipulación realizada durante el procedimiento de irradiación, en paralelo ratones control se sometieron a la misma inmovilización.

3. Inactivación farmacológica de la actividad del hipocampo.

3.1. Fármacos.

- TTX (tetrodotoxina, Tocris Biosciences).
Toxina que bloquea selectivamente los canales de sodio dependientes de voltaje neuronales, por tanto, bloquea la propagación de potenciales de acción.

- CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina, Tocris Biosciences).
Antagonista selectivo de los receptores de glutamato tipo AMPA.

Para inactivar transitoriamente y selectivamente la actividad del hipocampo se realizaron administraciones intrahipocampales de 0,5 μ l de una mezcla de TTX (20 μ M) y CNQX (3mM) diluida en tampón fosfato salino (PBS).

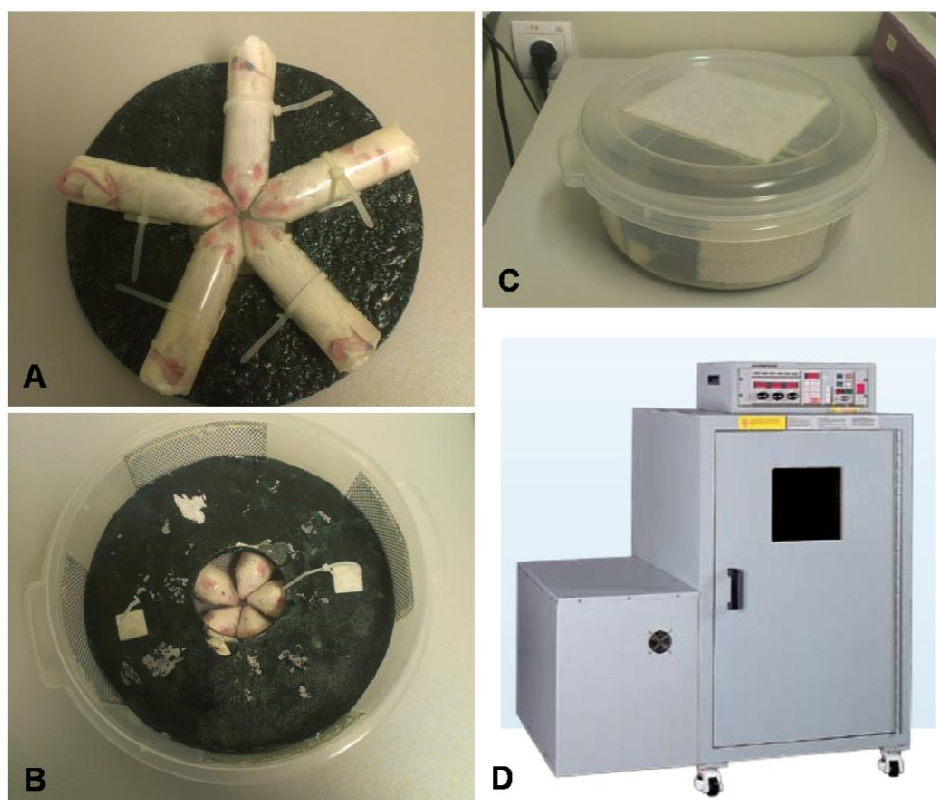


Figura 14. Procedimiento de irradiación con rayos X. **A**, Cinco ratones Swiss machos despiertos se inmovilizaron en compartimentos individuales por sesión de irradiación y se colocaron bajo una placa de plomo. **B**, La placa dispone de un orificio central para exponer a la irradiación únicamente la cabeza de los ratones, mientras que el resto del cuerpo queda protegido. **C y D**, Los ratones así dispuestos se colocaron en una caja doble con sistema de ventilación con filtro para su traslado desde el estabulario al servicio de irradiación, que consta de una cabina de irradiación (MBR-1505R, HITACHI) (*Imagen tomada de la casa comercial*).

3.2. Implantación de cánulas.

Los ratones fueron anestesiados por administración intraperitoneal de una solución de hidrato de cloral (Sigma-Aldrich, 4% en solución salina) a una dosis de 10 μ l por gramo de animal. Cuando el ratón estuvo completamente anestesiado, fue colocado en un marco estereotáxico. Bajo condiciones de esterilidad, se implantaron bilateralmente dos parejas de cánulas guía de acero inoxidable con un grosor de 21G en el hipocampo dorsal y ventral siguiendo las siguientes coordenadas estereotáxicas: Dorsal, coordenada antero-posterior

(AP)= -2,0mm, lateral (ML)= $\pm 1,4$ mm, profundidad (V)= -1,3mm; y Ventral, AP= -3,2mm, ML= $\pm 2,8$ mm, V= -3,25mm, AP y ML respecto a Bregma y V respecto a la superficie de la materia cerebral (**Fig.15**). Las cánulas se fijaron a la superficie craneal creando una base atornillada con cianocrilato y cemento dental (Duralay. Dental Mfg.Co.). Para evitar la obstrucción de las cánulas, se dejaron en su interior un alambre de acero inoxidable.

3.3. Administración del fármaco.

El fármaco o vehículo se administró tras al menos 7 días de recuperación de la cirugía y 30min antes de las sesiones conductuales. La jeringa de microinyección (Hamilton) fue introducida 10mm en la cánula guía. La velocidad de administración fue de 0,2 μ l/min. Una vez administrado 0,5 μ l, la microjeringa se mantuvo en la cánula durante un 1min para evitar el reflujo de fármaco al extraerla.

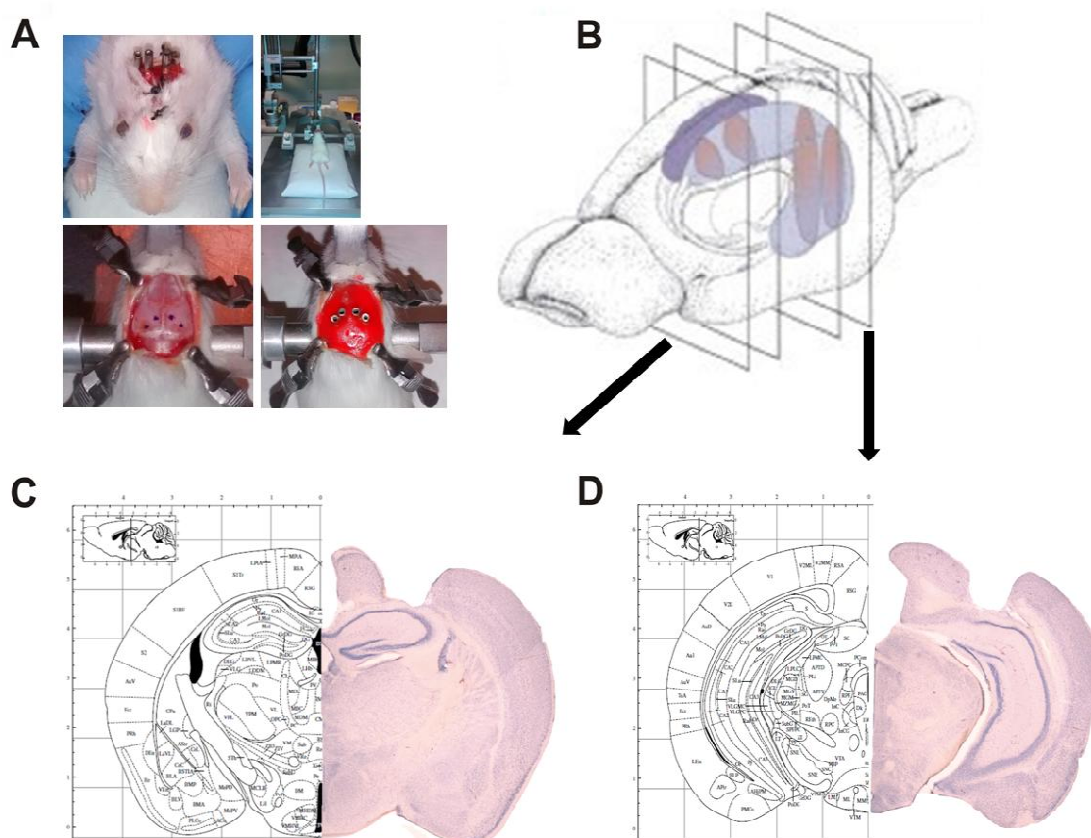


Figura 15. Localización hipocampal de las cánulas. **A**, Imágenes representativas de las distintas fases del procedimiento de implantación hipocampal de dos pares de cánulas mediante cirugía estereotáxica. **B**, Esquema representativo de un cerebro de ratón, donde se destaca el hipocampo (azul). **C y D**, Imágenes representativas de hemisecciones coronales de cerebro de ratón teñidos con la técnica de Nissl, donde se muestra la inserción de las cánulas hipocampales, a nivel dorsal (C) y ventral (D). A la izquierda de cada hemisferio se muestra un esquema del corte tomado del atlas anatómico de ratón (Paxinos y Franklin, Academic Press).

4. Electrofisiología

4.1. Implantación de electrodos.

Los ratones fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una solución de uretano (Sigma-Aldrich) en agua a una dosis de 1,8g por kilogramo de animal. Cuando el animal estuvo completamente anestesiado, fue colocado en un marco estereotáxico; la temperatura corporal fue monitorizada con una sonda rectal y la temperatura corporal fue estabilizada a 37°C con una manta térmica. Los electrodos de estimulación y registro fueron implantados unilateralmente (**Fig.16A**). Se colocó un electrodo bipolar concéntrico (World Precision Instruments, EE.UU.) en la vía perforante en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP= -4,2 mm y ML= 2,5mm respecto a Bregma y V= 1 o 1,5 mm respecto a la superficie de la materia cerebral, siendo su posición final aquella que produjo la óptima estimulación ortodrómica del giro dentado y el hipocampo. Se usó una fuente de corriente continua y un generador de pulsos (STG2004, Multicanal Systems, Reutlingen, Alemania) para administrar pulsos bifásicos de 0,1ms de carga en fase equilibrada. Como electrodo de registro se empleó un electrodo multicanal de silicio (32 canales; NeuroNexus Technologies, EE.UU.) implantado en el hipocampo en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP= 2,1 mm y ML= 1,2 mm, respecto a Bregma, y V= 2 mm respecto a la superficie de la materia cerebral, con el cual se registraron diferentes niveles de giro dentado y CA1 en el hipocampo ipsilateral a la vía perforante estimulada. La posición final de registro se ajustó y estandarizó entre experimentos en base al perfil espacio-temporal de potenciales evocados con estimulación de la vía perforante. Para confirmar la correcta localización de los electrodos, estos fueron bañados en una solución de Dil (1,1-diocetadecil-3,3,3,3-tetrametilindocarbocianina perclorato, colorante lipofílico fluorescente rojo) antes de ser implantados. Una vez concluido el experimento, el cerebro fue extraído y procesado para realizar tinciones con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, marcador fluorescente azul que se une a ADN) (**Fig.16B**).

4.2. Adquisición y análisis de registros.

Tras su filtrado (0,1- 3Hz) y amplificación, las señales electrofisiológicas se digitalizaron con una tasa de adquisición de 20kHz y se almacenaron en un ordenador para su procesamiento con el programa Spike2 y una aplicación propia desarrollada en MATLAB. Se realizaron análisis en GD y CA1 de hipocampo de dos parámetros: potencial postsináptico excitatorio de campo (fEPSP, del inglés “field excitatory postsynaptic potencial”), como medida de fuerza sináptica, y espiga poblacional (PS, del inglés “population spike”), como medida de la sincronía de la actividad excitatoria de la población de células que

disparan potenciales de acción en el área de registro. La amplitud de la PS es medida como la amplitud entre picos (positivo y negativo), mientras que los fEPSPs fueron medidos como la pendiente máxima de los potenciales. La actividad espontánea electrofisiológica fue calculada como la potencia de las señales electrofisiológicas espontáneas para determinadas bandas de frecuencia (delta 0,5-4Hz, theta 4-8Hz, alfa 8-12Hz, beta 12-30Hz, gamma 30-100Hz).

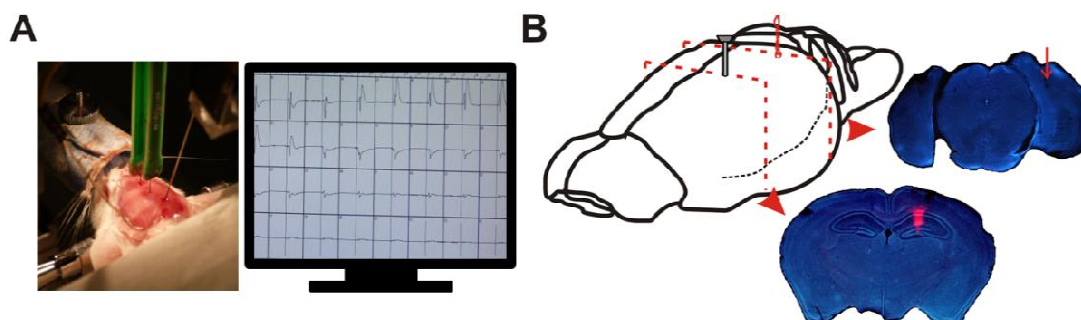


Figura 16. Localización de los electrodos en el hipocampo. **A**, Imagen de ratón Swiss siendo registrado en el marco esterotáxico, donde se puede apreciar la posición de los electrodos implantados mediante cirugía estereotáxica. **B**, Esquema representativo de la posición de los electrodos, de registro (gris) y de estimulación (rojo). Se muestran imágenes de cortes coronales contrateñidos con DAPI (colorante fluorescente azul) donde se observa la posición del electrodo de registro (hipocampo medial) marcado con Dil (colorante fluorescente rojo) y del electrodo de estimulación (hipocampo caudal) marcado por la lesión en el tejido (flecha roja).

4.3. Protocolos de estimulación y registro.

- Registros de actividad eléctrica espontánea.

Con el fin de estimar el grado de anestesia y el correcto funcionamiento basal de los circuitos cerebrales de cada animal, al inicio y al final de cada sesión de registro se realizaron 2 periodos consecutivos de 5min de duración de registros continuos de actividad eléctrica espontánea cerebral. Sobre cada uno de estos periodos de registro, se determinó el espectro de las oscilaciones cerebrales, centrándonos en las siguientes bandas de frecuencia: delta 0,5-4Hz, theta 4-8Hz, alfa 8-12Hz, beta 12-30Hz, gamma 30-100Hz. La estimulación de la amplitud relativa de cada rango de oscilación eléctrica en cada animal se realizó promediando los valores espectrales de ambos registros consecutivos.

- Curva estímulo-respuesta ("Input-Output curves").

Para estimar la transmisión sináptica al inicio y final de la sesión de registros, se determinó la relación entre la corriente de estimulación y la

respuesta provocada. Para ello, se realizó una secuencia de 6 pulsos únicos a diferentes intensidades de corriente (desde 50 a 1000 μ A) y con intervalo interpulso de 20s. Este patrón de estimulación se realizó en 10 ocasiones. La medida de la respuesta a una intensidad de estímulo dada se realizó promediando la PS y fEPSP en GD a esta intensidad en cada una de las secuencias.

- Estimulación con trenes de baja frecuencia (FDI, “frequency dependant inhibition”).

Con el fin de estimar la eficiencia de la transmisión trisináptica GD \rightarrow CA3 \rightarrow CA1 se determinó el acoplamiento funcional entre áreas hipocámpales. Para ello, se administró 3 trenes de 10 pulsos aplicados a 1Hz, con un intervalo entre trenes de 30s. Como medida de transmisión trisináptica hipocámpal se representó la respuesta promedio del PS en GD y del fEPSP en CA1, así como la relación fEPSP-PS en CA1 para cada uno de los pulsos del tren.

- Estimulación con trenes de alta frecuencia (LTP).

Para determinar los posibles cambios de eficiencia sináptica duradera en el hipocampo, en primer lugar, se realizó el registro de una línea base durante 15min con una secuencia de pulsos únicos a 0,05Hz. La intensidad del estímulo se ajustó para evocar una PS del 50% de la amplitud máxima en el GD. El curso temporal de la línea base se realizó promediando los fEPSP y PS evocados por 15 pulsos consecutivos cada 3min. Únicamente se consideran válidos los registros con una línea base de respuestas estables.

La inducción de la potenciación sináptica duradera (LTP) se realizó estimulando con trenes de alta frecuencia (TBS, del inglés “theta-burst stimulation”) de la vía perforante. Consistió en 6 series, espaciadas de 20s, de 6 trenes de 6 estímulos aplicados a 400Hz, espaciados 200ms (Davis y col., 1997). La intensidad de estimulación utilizada durante la inducción de LTP fue el doble de la empleada para el registro de la línea base (condiciones saturantes). La inducción de LTP fue monitorizada durante 2h con secuencias de pulsos únicos a 0,05Hz a la misma intensidad de estímulo empleada para la línea base. Un vez más, las medidas son promedios de fEPSPs o PS evocadas por 25 estímulos cada 5min y se expresó como porcentaje con respecto al valor medio de la línea base.

5. Pruebas conductuales

Consideraciones generales: En la habitación de conducta, se debe mantener una iluminación homogénea y reducir lo máximo posible el ruido, para evitar que los ratones sean distraídos por estímulos externos de su tarea. Se debe habituar a los ratones a la sala, para evitar que el estrés del traslado desde su lugar de estabulación influya en las pruebas. Además, es conveniente la limpieza con etanol (70% en agua) de las superficies de trabajo entre sesiones y animales, para evitar que el rastro de otros animales influya en la conducta.

- Actividad motora y exploratoria en campo abierto.

Para evaluar la actividad motora, se colocó al ratón en un campo abierto (38x21x15cm) acoplado a un actímetro (Cybertec S.A.) durante 15min. Este aparato consiste en una plataforma con paredes que poseen emisores y sensores infrarrojos (IR). A su vez, este sensor de movimiento está conectado a un ordenador que registra el número de veces que el ratón interrumpe los haces IR por minuto.

Para evaluar la actividad exploratoria, se colocó al ratón en un campo abierto (55x40x40cm) que contiene dos objetos en su interior y medimos el tiempo de interacción del animal con los objetos durante una sesión de 15min. De este modo, estos parámetros nos permiten también estimar las capacidades visuales y olfativas de los animales.

- Rotarod.

Para estimar la coordinación motora y el aprendizaje motor se utilizó un rotarod. El rotarod (Ugo Basile Biological Research Apparatus) consiste en un rodillo de plástico (3cm de diámetro y 30cm de longitud) en posición horizontal cuya superficie es rugosa, para facilitar la sujeción de los animales y que gira a una velocidad controlada. A lo largo del rodillo se disponen perpendicularmente platillos circulares generando 5 calles de ejercicio (6cm de diámetro). Antes de realizar la prueba, los ratones fueron habituados al rotarod colocándolos sobre el rodillo a una velocidad constante de 20rpm durante 1min. La prueba de aprendizaje motor constó de 4 sesiones de entrenamiento de 5min en un solo día. En cada sesión la velocidad de giro del rodillo fue acelerando hasta 60rpm y se evaluó el número de caídas del cilindro. Finalmente, se evaluó memoria motora realizando una única sesión al día siguiente, en las mismas condiciones explicadas anteriormente.

- Reconocimiento de objetos nuevos.

Los ratones exploran de forma innata la novedad y evitan lo familiar. Esta capacidad se aprovecha para realizar pruebas de aprendizaje y memoria de discriminación de objetos nuevos frente a aquellos familiares. Esta prueba se llevó a cabo en un campo abierto rectangular (55x40x40cm) en el cual se expone al ratón a diferentes objetos en función del protocolo a realizar. En primer lugar, los ratones fueron habituados al campo del ensayo durante 5min. Posteriormente, se realizó una sesión de entrenamiento, donde el ratón pudo explorar dos objetos idénticos durante 15min. Estas condiciones aseguran un óptimo recuerdo a largo plazo. Todas las sesiones fueron grabadas para su posterior análisis off-line. Los objetos utilizados fueron piezas de plástico con formas y colores diferentes, las cuales son limpiadas rigurosamente entre ensayos para evitar estímulos olfativos que puedan influir en la prueba. La evaluación de la memoria del animal a cada uno de los objetos se realizó off-line comparando el tiempo que exploró el objeto novedoso frente al del familiar. Así, la exploración relativa del objeto novedoso se expresa como un índice de discriminación $ID = (t_{\text{novedoso}} - t_{\text{familiar}}) / (t_{\text{novedoso}} + t_{\text{familiar}})$. Los criterios de exploración se basan estrictamente en una exploración activa. El ratón debe posicionarse hacia el objeto a una distancia de $\pm 1,5\text{cm}$ y/o tocándolo con la nariz o las vibrisas. No se considera exploración el dar vueltas alrededor del objeto o colocarse sobre él. Además, todos los ensayos son realizados por el experimentador sin conocer el tratamiento farmacológico y/o manipulación que ha recibido cada ratón.

Tras la sesión de entrenamiento se realizaron alguno de los siguientes protocolos dirigidos a evaluar:

■ Adquisición y consolidación:

Tras la sesión de entrenamiento, se realizó una sesión de 10min donde el ratón se expuso a un objeto familiar y otro novedoso. Si esta sesión se realiza 1h tras el entrenamiento nos dará idea de la adquisición de información. Si se realiza más de un día después del entrenamiento nos dará información de consolidación de memoria.

■ Reconsolidación sin novedad:

Se realizó una sesión de reactivación 3 días después del entrenamiento, en la cual el ratón se expuso a los mismos objetos usados en la sesión de entrenamiento durante 10min. La sesión de retención de la memoria se llevó a cabo 3 días después de la sesión de reactivación, exponiendo al ratón a un objeto familiar y otro novedoso durante 10min.

■ Reconsolidación con novedad:

Se realizó una sesión de reactivación de 10min 3 días después del entrenamiento, en la cual el ratón se expuso a un objeto familiar y a otro novedoso. La sesión de retención de la memoria se realizó 3 días después de la sesión de reactivación, y en ella el ratón se expuso de nuevo a un objeto familiar y otro novedoso durante 10min.

- Evitación Pasiva.

Los ratones tienen una preferencia innata por ambientes oscuros y cerrados. En base a ello, el animal en esta prueba debe aprender a evitar su tendencia innata para no recibir un estímulo aversivo. El aparato de evitación pasiva (Ugo Basile Biological Research Apparatus) consiste en una caja (47x18x26cm) dividida en dos compartimentos de iguales dimensiones (28,5x18x26cm), uno claro que dispone de luz y otro oscuro, comunicados por una puerta. Antes de realizar la prueba, se habituó al ratón al aparato permitiéndole moverse libremente durante un 1min. En la sesión de entrenamiento, se confinó al ratón en el compartimento claro durante 30s. Transcurrido este tiempo, se abrió la puerta que separa los compartimentos y se encendió la luz. Una vez que el ratón pasó al compartimento oscuro, la puerta se cerró automáticamente y recibió un estímulo eléctrico (0,5mA durante 5s) a través del suelo (rejilla) del aparato. Se registró la latencia de entrada al compartimento oscuro. Tras la sesión de entrenamiento, se realizó una sesión para evaluar la retención de la memoria a los tiempos indicados según cada experimento, en la cual se expuso al ratón a la misma experiencia, de modo que, el recuerdo del choque eléctrico hiciera que evitara entrar al compartimento oscuro o al menos aumentara la latencia de entrada al mismo (latencia de escape) con respecto a la sesión de entrenamiento. Para comparar los resultados obtenidos, representamos la latencia de escape promedio de cada grupo experimental en las distintas sesiones realizadas.

6. Sacrificio y extracción de tejido

En todos los casos, los ratones fueron anestesiados con administración intraperitoneal de hidrato de cloral (Sigma-Aldrich, 4% en solución salina) a una dosis de 10µl por gramo de animal y perfundidos intracardiamente con solución salina (0,9% NaCl en agua) empleando una jeringa de 20ml (40ml de solución por animal) y aguja de 22G de grosor. Posteriormente, el ratón fue decapitado y el cerebro extraído. Un hemisferio se procesó para histología, se fijó por inmersión en una solución de paraformaldehído (4% en solución salina) durante 48h a 4°C y se crioprotegió por inmersión en una solución de sacarosa

(30% en solución salina) hasta alcanzar el equilibrio a 4°C; mientras que, el otro hemisferio se procesó para el análisis de expresión génica; se microdisecionó el hipocampo, y se conservó a -80°C.

7. Análisis de expresión génica

7.1. Extracción de ARN.

Se realizó una extracción de ARN total a partir de tejido congelado (-80°C) siguiendo el siguiente protocolo:

- Se añadió 1ml de reactivo de extracción (Total ARN Extraction Kit Easy-Blue™, Intron Biotechnology) y 1µl de glicógeno (Thermo Scientific) por cada 50-100mg de tejido. Previamente, se limpiaron los tubos de homogenización con una solución de NaOH (0,1M en agua) durante 20min. Posteriormente, se lavaron las trazas de NaOH con agua destilada autoclavada.
- La homogenización del tejido se realizó en Gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec) usando el programa específico para tejido congelado.
- El homogenado se centrifugó a 4°C durante 1min a 12000rpm y se pasó a un tubo eppendorf de 1,5ml.
- Se añadió 200µl de cloroformo por cada mililitro de reactivo de extracción añadido al inicio y se agitó en vórtex durante 15s.
- Se incubó 10min a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 4°C durante 15min a 12000rpm.
- La fase acuosa se recuperó y se añadió a un nuevo tubo, 500µl aproximadamente por cada mililitro de reactivo de extracción añadido al inicio.
- Para precipitar ARN, se añadió 500µl de 2-propanol por cada mililitro de reactivo de extracción añadido al inicio y se mezcló por inversión (5-6 veces)
- Se incubó 10min a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 4°C durante 10min a 12000rpm.
- Se descartó el sobrenadante y se añadió al precipitado 1ml de etanol 75%. Se mezcló por inversión (5-6 veces).
- Se centrifugó a 4°C durante 5min a 12000rpm.
- De nuevo se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó bajo una lámpara.
- El precipitado de ARN se resuspendió en 20-40µl de agua destilada estéril mediante pipeteo y posteriormente se incubó 10-15min en el baño a 65°C.

El ARN obtenido se conservó a -20°C.

7.2. Cuantificación de ARN obtenido.

Para cuantificar el ARN obtenido, se midió la absorbancia de nuestras muestras en un espectrofotómetro (MaestroNano® Spectrophotometer, MaestroGen Inc.). Tras realizar el blanco con agua destilada estéril, se colocó 1µl de muestra y el aparato determinó el valor de concentración de ARN (ng/µl), y la relación de absorbancia a 260nm (ARN) y 280nm (proteínas) de cada una de las muestras, como indicador del grado de pureza de nuestro ARN. Entre medida y medida, se limpió el dispositivo con agua destilada estéril.

7.3. Retrotranscripción.

A partir de ARN total, se realizó la retrotranscripción para obtener ADN complementario (ADNc). Se prepararon reacciones independientes para cada muestra de ARN, empleando un kit comercial liofilizado de retrotranscripción (RevoScript Reverse Transcriptase PreMix Random Primer, iNtRON Biotechnology, INC.), el cual incluye todos los componentes necesarios para cada reacción (dNTPs, hexanucleótidos al azar ("random primers"), tampón, inhibidores de ARNasas, retrotranscriptasa). Para un volumen final de 20µl, se añadió el volumen de ARN total necesario para completar 1µg y el resto de agua estéril. La reacción de retrotranscripción se realizó en un bloque térmico (BIOER) programado con las condiciones suministradas por el fabricante:

- Síntesis de ADNc a 50°C durante 60min.
- Inactivación de la retrotranscriptasa a 95°C durante 5min.

El ADNc obtenido se conservó a -20°C.

7.4. PCR semicuantitativa

Se prepararon reacciones independientes para cada muestra de ADNc con un volumen final de 25µl. Añadimos las siguientes cantidades de componentes por reacción:

- 11,2µl de agua estéril
- 12,5µl de Taq polimerasa (Taq Green 2X, Thermo Scientific)
- 0,4µl de cada pareja de cebadores 25mM ("primers")
- 1µl de ADNc

En la tabla 1 aparece la secuencia de los cebadores empleados (IDT, Integrated DNA Technologies).

Tabla 1. Cebadores empleados en análisis de expresión génica por PCR semicuantitativa. Se indica una descripción del gen, la secuencia y la temperatura de alineamiento de cada pareja de cebadores.

Gen	Descripción	Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (pb)
cd11b	Integrina αM (marcador de microglia)	F	5'- CCTTGTCTCTTTGATGCAG -3'	62	216
		R	5'- GTGATGACAACCTAGGATCTT -3'		
cnpasa	2',3' nucleótido cíclico 3' fosfodiesterasa (marcador de oligodendrocitos)	F	5'- GAAGGCCGCTGGGGCAGAAG -3'	62	251
		R	5'- CTGCACTGGCTGCACGTCG -3'		
glast	Transportador de glutamato glial (marcador de astroglia)	F	5'- TCCCCACGCCATGGCATCAAC -3'	60	215
		R	5'- GCGATGCCAAGCGAAGCAGC -3'		
vimentina	Proteína de los filamentos intermedios (marcador de precursor - glial)	F	5'- ACAATGCTTCTCTGGCAGTCT -3'	62	216
		R	5'- TTCTTGGCAGCCACGCTTTCAT -3'		
gfap	Proteína ácida fibrilar de glía (marcador de precursor)	F	5'- TCCTGGAACAGCAAAACAAG -3'	60	223
		R	5'- CAGCCTCAGGTTGGTTTCAT -3'		
pCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación (marcador de precursor)	F	5'- CTGCGACCGCAACCTAGCCA -3'	60	255
		R	5'- CGTGCAAATTCACCCGACGGC -3'		
nestina	Proteína de los filamentos intermedios (marcador de precursor - neuronal)	F	5'- GGCAGCAACTGGCACACCTCA -3'	60	204
		R	5'- GGCTGAGGACAGGGAGCACAGA -3'		
dcx	Doble cortina, proteína asociada a microtúbulos (marcador de neurona inmadura)	F	5'- CCAATGCGCCGCGCAAGTC -3'	62	168
		R	5'- TGACAGCGGCAGGTACAGGTC -3'		
tuj1	Beta tubulina neuronal (marcador de neurona madura)	F	5'- CTCCCAGGTTAAAGTCCTTCAGTA -3'	60	100
		R	5'- GCAACATAAATACAGAGGTGGCTA -3'		
ncam	Molécula de adhesión de célula neuronal (marcador de neurona madura)	F	5'- CACCATCTACAACGCCAACATC -3'	62	178
		R	5'- CATCACAGACAATCACAGCATCC -3'		
calbindina	Proteína de unión a calcio (marcador de neurona madura de giro dentado)	F	5'- GCAAAATGTGTGCTGAGAA -3'	62	267
		R	5'- GGAACCTCTTCTCTCTGACT -3'		
cx3r	Receptor de quimioquina (marcador de respuesta inflamatoria)	F	5'- GCCTCTGGTGGAGTCTGCGTG -3'	60	273
		R	5'- TGGGCTTCCGGCTGTGGTG -3'		
cd68	Glicoproteína de macrófagos (marcador de respuesta inflamatoria)	F	5'- GGGGCTCTTGGGAACAC -3'	58	194
		R	5'- GTACCGTCACAACCTCCCTG -3'		
tnfa	Factor de necrosis tumoral, citoquina (marcador de respuesta inflamatoria)	F	5'- GGCAGGTCTACTTTGGGAGTCATTGC -3'	58	150
		R	5'- ACATTGAGGCTCCAGTGAATTCGG -3'		
il1β	Interleuquina 1 beta, citoquina producida por macrófagos activados (marcador de respuesta inflamatoria)	F	5'- AAAAGCCTCGTGCTGTCGGAC -3'	58	196
		R	5'- GCAGGGTGGGTGTGCCGTCT -3'		
caspasa3	Cisteína proteasa que se activa específicamente en células en proceso de muerte (marcador de muerte celular)	F	5'- TGGACTGTGGCATTGAGACAG -3'	58	186
		R	5'- CGACCGTCCTTGAATTC -3'		
gapdh	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, enzima de la glucólisis (marcador de expresión constitutiva)	F	5'- GTAGGCCAAGTTGCCTGTCCGT -3'	60	190
		R	5'- ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG -3'		

Posteriormente, una vez preparadas las mezclas de reacción, se colocaron las muestras en un termociclador (Biometra) programado con las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 5min
- N número de ciclos de amplificación:
 - 20s a 95°C
 - 30s a la temperatura específica de alineamiento de cada pareja de cebadores
 - 30s a 72°C
- Extensión final a 72°C durante 5min
- Mantener el producto de PCR a 4°C

Se extrajeron alícuotas del producto de amplificación desde 20 ciclos hasta 40 ciclos de amplificación, con un espaciamiento de 5 ciclos, con la finalidad de elegir entre los mismos el punto en el que la reacción no haya alcanzado la saturación para su cuantificación.

7.5. Electroforesis de ADN.

La visualización del producto amplificado en cada ciclo se realizó llevando a cabo electroforesis en gel de agarosa, siguiendo los siguientes pasos:

- Se preparó un gel de agarosa con un número de pocillos adecuado al número de muestras y a un % de concentración adecuado para el tamaño de fragmento amplificado (generalmente, 2%) en tampón TBE (Tris-Base 89mM, Ácido Bórico 89mM y EDTA 1mM a pH8) con bromuro de etidio (Serva GmbH) a una concentración final de 0,5mM.
- Una vez polimerizado el gel, se colocó en una cubeta de electroforesis, de modo que los pocillos queden hacia el polo negativo, ya que el ADN tiene carga negativa, y así pueda migrar a través del gel hacia el polo positivo.
- Se llenó la cubeta de electroforesis con tampón TBE hasta cubrir por completo el gel.
- Se cargaron las muestras en cada uno de los pocillos del gel. En nuestro caso, no fue necesario añadir tampón de carga para proporcionar densidad a nuestras muestras, puesto que, está incluido por defecto en el tampón de Taq polimerasa empleado. Además, para confirmar la correcta amplificación del fragmento deseado, se cargó un marcador de tamaño adecuado al tamaño de fragmento amplificado, generalmente de un rango de 50-1000pares de bases (FastRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific).

- Se conectó la cubeta a una fuente eléctrica de alimentación y la electroforesis se realizó a voltaje constante hasta que las muestras migraran lo suficiente como para identificar el tamaño de nuestro amplicón.

Una vez finalizada la electroforesis del ADN, se observaron las bandas obtenidas exponiendo el gel a luz ultravioleta para que el bromuro de etidio intercalado en el ADN emita fluorescencia (a cierto rango de cantidad de ADN, la fluorescencia emitida es proporcional al ADN existente). Por último, se capturó una imagen del gel mediante una cámara digital (Major Science) para ser analizada.

7.6. Cuantificación de ADN obtenido.

Se empleó el programa de análisis de imagen ImageJ, software libre disponible en la siguiente dirección web: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Este programa permite la cuantificación de ADN por densitometría óptica. Se tomó el valor de densidad óptica de cada banda en relación al fondo de la imagen de captura, lo cual es proporcional a la cantidad de ARN mensajero (ARNm) de ese gen en la muestra de partida (valor de expresión del gen). Estos valores son relativizados frente a los de un gen de expresión constitutiva (β -actina o gapdh).

8. Histología.

Los cerebros ya fijados y crioprotegidos fueron cortados en secciones coronales de 50 μ m de grosor con un microtomo de congelación (Leica SM 2000R, Leica Microsystems) en 6 series, las cuales se conservaron en placas multipocillos (24 pocillos) conteniendo solución anticongelante (30% Glicerina, 30% Etilenglicol, 20% Tampón fosfato (PB2x 160mM Na₂HPO₄ dodecahidratado y 40mM NaH₂PO₄ dihidratado, y 20% Agua destilada). Las placas se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso en alguno de los siguientes protocolos:

8.1. Tinción de Nissl.

El fundamento de la tinción de Nissl es el uso de un colorante básico (azul de toluidina, azul de metileno o violeta de cresilo) que, en un medio ácido, reacciona con los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos. Como resultado, se tiñen los núcleos de todas las células (neuronas y células gliales) y la sustancia

de Nissl (ribosomas libres y asociados a membranas). Esta técnica es utilizada para el estudio de detalles citológicos y citoarquitectónicos.

Para llevar a cabo esta tinción, seguimos los siguientes pasos:

- Se realizaron varios lavados con tampón fosfato salino (PBS, una solución de PB2x al 0,05% y NaCl 0,15M en agua), para lavar el anticongelante de los tejidos.
- Se montaron las secciones en portaobjetos gelatinizados empleando solución de montaje (0,5% gelatina (Panreac Química S.A.U) y 25% etanol en agua) y se dejaron secar al menos 24h.
- Se preparó el colorante para la tinción, en nuestro caso azul de toluidina al 0,1% en tampón acético-acetato a pH ácido (3-4).
- Se sumergieron los portaobjetos en colorante durante 30s.
- Se lavó 2 veces en agua destilada durante 1min.
- Se deshidrató mediante una batería de alcoholes de concentración creciente:
 - Alcohol al 70% durante 1min.
 - Alcohol al 90% durante 1min.
 - Alcohol al 100% durante 1min.
- Se aclaró dos veces en xilol durante 1min.
- Se cubrió con DPX (Panreac Química S.A.U.) y cubreobjetos.
- Se dejó secar varios días y se limpió las preparaciones retirando el exceso de DPX con una cuchilla y alcohol al 70%.

Las preparaciones se conservaron a temperatura ambiente.

8.2. Inmunohistoquímica

El fundamento de la inmunohistoquímica (IHQ) es la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos presentes en las células o tejidos, de modo que se hacen visibles a través de la reacción enzimática, directa o indirecta, con un sustrato que produce una coloración. Esta técnica se emplea para estudios precisos de morfología, localización y expresión de antígenos.

Para llevar a cabo esta técnica, seguimos el siguiente protocolo para cortes flotantes en agitación (modificado de Martínez y Belmonte, 1996):

- Se lavó el anticongelante: 3 lavados de 4min en PBS.
- Se permeabilizó el tejido: 3 lavados de 8min en PBS 0,5% Tritón X-100 (AppliChem).
- Se lavó el detergente: 2 lavados de 8min en PBS.

- Para la inactivación de la actividad peroxidasa endógena, se incubó en una solución de 25% Agua destilada, 25% PB2x, 50% etanol y 1,66% H₂O₂ durante 20min.
- Se realizaron 2 lavados de PBS de 10min.
- Se equilibró el tejido: 2 lavados de 10min en PBS 0,5% Tritón X-100.
- Para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, se incubó durante 1h con una solución de bloqueo (10% gelatina y 10% suero fetal bovino (PAA Laboratorios GMBH)) en PBS 0,5% Tritón X-100.
- Se incubó con el anticuerpo primario a la dilución adecuada (Tabla 2) en una solución 10% gelatina y 3% suero fetal bovino en PBS 0,5% Tritón X-100) durante 30min a temperatura ambiente y luego durante 12h a 4°C.
- Se incubó 30min a temperatura ambiente.
- Se lavó el exceso de anticuerpo primario: 4 lavados de 10min en PBS 0,5% Tritón X-100
- La incubación con el respectivo anticuerpo secundario acoplado a biotina se realizó durante 1h a temperatura ambiente diluyendo este en 10% gelatina, 3% suero fetal bovino en PBS 0,5% Tritón X-100. La dilución del anticuerpo secundario se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos empleados en inmunohistoquímica. Se indica una descripción de los antígenos, la dilución empleada de los anticuerpos, su huésped de generación, la casa comercial y su referencia.

Anticuerpo Primario	Descripción	Dilución	Huésped	Casa comercial	Referencia
Calbindina	Proteína de unión a calcio (marcador de neurona madura)	1:3000	Ratón	Swant	300
Dcx	Doble cortina, proteína asociada a microtúbulos (marcador de neurona inmadura)	1:400	Cabra	Santa Cruz	Sc-8066
Nestina	Proteína de los filamentos intermedios (marcador de precursor neuronal)	1:250	Pollo	GeneTex	GTX-85457

Anticuerpo Secundario	Dilución	Huésped	Casa comercial
Anti- IgG ratón	1:1000	Caballo	Vector
Anti- IgG cabra	1:500	Conejo	Vector
Anti - IgG pollo	1:250	Burro	Jackson ImmunoResearch

- Se lavó el exceso de anticuerpo secundario: 3 lavados de 8min en PBS 0,5% Tritón X-100.
- Se lavó el detergente: 3 lavados de 5min en PBS.
- Para amplificar la reacción se incubó con una solución avidina-estreptavidina-peroxidasa (kit comercial ABC, Vector Laboratories Inc.) durante 1h. La solución consistió en una proporción 3:3 (µl) de los reactivos A y B por mililitro de PBS, la cual debe ser preparada al

menos 20min antes de su utilización para permitir la formación de los complejos.

- Se lavó el exceso: 3 lavados de 8min en PBS 0,5% Tritón X-100.
- Se lavó el detergente: 3 lavados de 5min en PBS.
- Se reveló, siguiendo alguno de los siguientes métodos:
 1. Solución de revelado con diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich): 16,6µl DAB (30mg/ml) y 0,3µl H₂O₂ por mililitro de PBS
 2. Solución de revelado intensificada con metal pesado: misma composición que la anterior más 0,1% de sulfato de níquel.
 3. Kit comercial de revelado por pastillas (Sigma-Aldrich): pastilla de DAB y pastilla de urea por cada 15ml de agua destilada.

Se incubó el tiempo necesario para ver la señal con la solución de revelado y se paró la reacción retirando el exceso de la misma mediante lavados con PBS.

- Se lavó con PBS (5-6veces).
- Se montaron los cortes en portaobjetos empleando solución de montaje y dejamos secar al menos 24h.
- Se deshidrató mediante una batería de alcoholes de dilución creciente (Opcional).
- Se sumergieron los portaobjetos en xilol durante 5min.
- Se cubrió con DPX y cubreobjetos.
- Se dejó secar varios días y se limpiaron las preparaciones retirando el exceso de DPX con una cuchilla y alcohol al 70%.

Las preparaciones se conservaron a temperatura ambiente.

8.3. Inmunofluorescencia

El fundamento de la inmunofluorescencia (IF) es similar a la inmunohistoquímica, salvo que en este caso la reacción antígeno-anticuerpo se hace visible en base a anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos. Los fluorocromos son moléculas que emiten fluorescencia cuando se les excita con una determinada longitud de onda. El potencial de esta técnica radica en la posibilidad de llevar a cabo una inmunodetección múltiple. Esto es posible porque seleccionando intervalos de longitudes de onda podemos excitar y detectar de forma individual y secuencial distintos fluorocromos, de modo que superponiendo las imágenes tomadas, se pueden realizar estudios de colocalización.

Para llevar a cabo esta técnica, seguimos el siguiente protocolo para cortes flotantes en agitación (modificado de Ruiz y col., 2011):

- Se lavó el anticongelante: 3 lavados de 1min en PBS.
- Se permeabilizó el tejido: 1 lavado de 1h en PBS 1% Tritón X-100 (AppliChem).
- Para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, se incubó el tejido durante 1h en 5% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) en PBS 1% Tritón X-100.
- Se incubó con el anticuerpo primario a la dilución adecuada (tabla 3) en 1% BSA en PBS 1% Tritón X-100 durante 30min a temperatura ambiente y luego durante 12h a 4°C.
- Se incubó 30min a temperatura ambiente.
- Se lavó el exceso de anticuerpo primario: 6 lavados de 10min en PBS 0,1% Tritón X-100
- La incubación con el respectivo anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo deseado se realizó en 1% BSA en PBS 0,1% Tritón X-100 durante 1h a temperatura ambiente. La dilución del anticuerpo secundario se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos empleados en inmunofluorescencia. Se indica una descripción de los antígenos, la dilución empleada de los anticuerpos, su huésped de generación, la casa comercial y su referencia.

Anticuerpo Primario	Descripción	Dilución	Huésped	Casa comercial	Referencia
Iba1	Proteína de unión a calcio específica de microglía (marcador de respuesta inflamatoria)	1:500	Conejo	Wako	019-19741
GAD67	Enzima que participa en la síntesis de GABA (neurotransmisor inhibitorio)	1:500	Ratón	Merck Millipore	MAB5406
NeuN	Proteína nuclear específica de neuronas (marcador de neuronas maduras)	1:500	Ratón	Merck Millipore	MAB377
Calretinina	Proteína de unión a calcio (marcador de neurona inmadura y de una población de interneuronas)	1:500	Conejo	Swant	7697
Parvoalbúmina	Proteína de unión a calcio (marcador de una población de interneuronas)	1:500	Cabra	Swant	PVG213
Egr-1	Factor de transcripción de genes de expresión rápida (marcador de actividad neuronal)	1:1000	Conejo	Santa Cruz	Sc-189
Cfos	Factor de transcripción de genes de expresión rápida (marcador de actividad neuronal)	1:1000	Conejo	Santa Cruz	Sc-52
DCX	Doblecortina, proteína asociada a microtúbulos (marcador de neurona inmadura)	1:100	Cabra	Santa Cruz	Sc-8066

Anticuerpo Secundario	Dilución	Huésped	Casa comercial
Anti IgG conejo AlexaFluor 594	1:500	Burro	Invitrogen
Anti IgG ratón AlexaFluor 488	1:500	Burro	Invitrogen
Anti IgG ratón AlexaFluor 594	1:500	Burro	Invitrogen
Anti IgG conejo 647	1:400	Burro	SantaCruz
Anti IgG cabra 488	1:400	Burro	SantaCruz
Anti IgG conejo 488	1:400	Burro	SantaCruz

- Se lavó el exceso de anticuerpo secundario: 6 lavados de 10min en PBS 0,1% Tritón X-100
- Se lavó el detergente: incubar en PBS.
- Se montaron los cortes en portaobjetos empleando glicerol 50% en agua. Se colocó un cubreobjetos, se selló con laca de uñas y se dejó secar en oscuridad.

Las preparaciones deben ser conservadas en oscuridad y a 4°C, para evitar la pérdida de fluorescencia de las muestras.

8.4. Captura y análisis de imagen.

Las imágenes de las preparaciones de IHQ fueron tomadas con un microscopio óptico Leica DMRB RFY HC acoplado a una cámara Leica DC500; mientras que las de IF, fueron tomadas con un microscopio confocal de fluorescencia Leica SPE DM 2500.

En ambos casos, para las cuantificaciones de áreas y marcajes obtenidos, se empleó el programa de análisis de imagen Fiji, software libre disponible en la siguiente dirección web: <http://fiji.sc/Fiji>.

Para cuantificar áreas, se seleccionó la región de estudio con la herramienta de trazado libre y se ejecutó la opción de análisis “Medida/Measure”. Para cuantificar el número de células positivas para un determinador marcador, se emplearon dos posibles opciones en función de la técnica de inmunomarcaje empleada. En IHQ, se empleó la herramienta adicional del software (plugin) “Contador celular/Cell Counter”, realizando un conteo manual de células marcadas bajo un criterio óptimo de selección ajustado en cada caso. En IF, en primer lugar se realizó una proyección máxima de las imágenes capturadas por microscopía confocal (22 secciones por corte de 2µm de separación) y a continuación, se realizó un estudio de “máximos de intensidad/Find maxima” aplicando una tolerancia de ruido ajustada para cada marcador y experimento. Para análisis de colocalización por IF, se fusionaron los canales de captura para cada marcador y corte en cuestión, y se realizó una proyección ortogonal con vistas XZ e YZ para comprobar la correcta colocalización célula a célula.

Para minimizar variabilidad, se analizaron como mínimo 4 ratones por grupo experimental y como mínimo 4 cortes de hipocampo por animal: dos, rostral (situados entre -1,58 y -2,06 mm con respecto a Bregma) y dos, caudal (situados entre -2,92 y -3,50 mm con respecto a Bregma). Además, todas las imágenes fueron capturadas manteniendo los mismos parámetros y los análisis fueron realizados por el experimentador sin conocer el tratamiento y/o manipulación que ha recibido cada ratón.

9. Análisis Estadístico.

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado utilizando el paquete estadístico del programa Microsoft Excel para sistema operativo Windows. En líneas generales, salvo que se indique otra cosa, los datos son expresados por la media \pm error medio estándar. Utilizamos ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre grupos; ANOVA de dos vías, para analizar la interacción entre factores y T-Student, para muestras emparejadas dentro de cada grupo. La hipótesis nula fue rechazada con un α del 95% y por tanto, los valores de significación se tomaron con $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

- 4.1. Modificación de un protocolo clásico de eliminación de neurogénesis para nuevas aplicaciones: Caracterización del modelo.***
- 4.2. Estudio de implicación de la neurogénesis hipocampal adulta en la adquisición y formación de memorias, y en los cambios de eficiencia sináptica duraderos.***
- 4.3. Papel de la neurogénesis hipocampal adulta en la modificación de memorias.***
- 4.4. Reclutamiento de neuronas maduras e inmaduras por el circuito hipocampal en el procesamiento de información de reconocimiento de objetos.***

1. MODIFICACIÓN DE UN PROTOCOLO CLÁSICO DE ELIMINACIÓN DE NEUROGÉNESIS PARA NUEVAS APLICACIONES: Caracterización del modelo.

1.1. Una única sesión de irradiación con rayos X a baja intensidad provoca una eficiente y selectiva ablación de la neurogénesis hipocampal adulta.

Para determinar si los distintos estadios neuronales inmaduros están involucrados en las diferentes fases de los procesos cognitivos que dependen del hipocampo, es necesario desarrollar un método rápido para eliminar los precursores y neuronas inmaduras producto de la neurogénesis adulta en ratón, y realizar comportamiento pocas horas después. Para ello, elegimos un protocolo de irradiación local del cerebro con una única dosis de 10Gy administrada a baja intensidad (0,35Gy/min) en el animal despierto e inmovilizado. Para caracterizar este modelo, se comparó por RT-PCR semicuantitativa la expresión de los genes marcadores neurogénicos, neuronales y gliales, en el hipocampo de ratones sacrificados 24h después de la irradiación y en animales no irradiados. La irradiación redujo en más del 50% el ARN mensajero (ARNm) que codifica para marcadores de diferentes estadios neurogénicos, desde precursores (vimentina, gfap, pcna, nestina) a neuronas inmaduras (doblecortina [dcx]), sin afectar a marcadores de neuronas maduras (tuj1, ncam y calbindina) o células gliales maduras (glast [astrocitos], cnpsa [oligodendrocitos] y cd11b [microglía]) (**Fig.17**).

Dado que esta metodología permite realizar conducta poco después de una sesión de irradiación, realizamos un estudio más específico del efecto de la irradiación 4-6h después de ésta. La inmunohistoquímica contra Calbindina de cerebros de ratones no irradiados e irradiados, no reveló alteraciones histológicas groseras (**Fig.18A y 18B**). Sin embargo, el análisis por inmunofluorescencia contra DCX de los nichos neurogénicos en el cerebro adulto, la zona subventricular de los ventrículos laterales (SVZ) y la zona subgranular de GD (SGZ), corroboró pérdida celular, mientras que en la corteza piriforme (CP), donde DCX se expresa en neuronas maduras, no se observa alteración al comparar ratones no irradiados e irradiados (**Fig.19**). La cuantificación de pérdida de células neurogénicas en GD mostró disminuciones del $85,44\% \pm 4,44\%$ de células precursoras neuronales, positivas para Nestina (**Fig.20A**) y $93,86 \pm 2,95\%$ de neuronas inmaduras, positivas para DCX

(Fig.20A), sin afectar a las neuronas maduras, positivas para Calbindina del GD (Fig.20B).

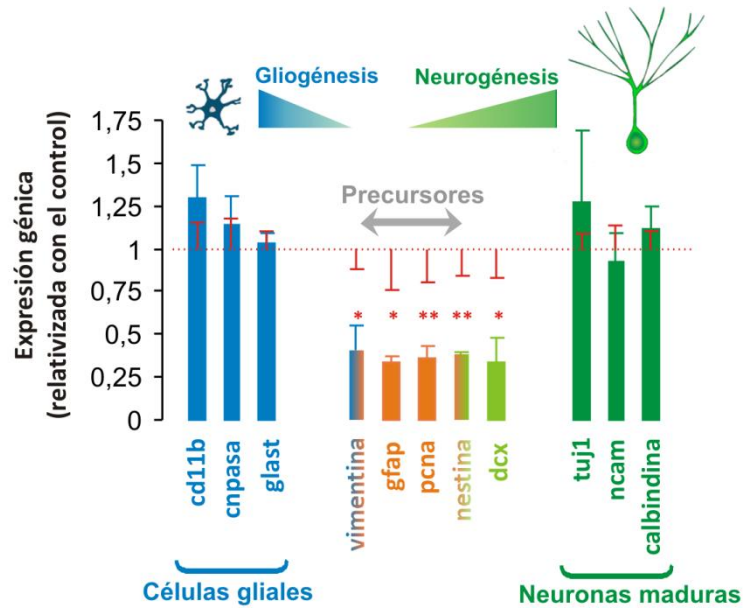


Figura 17. La irradiación con rayos X a baja intensidad en el ratón despierto provoca una reducción selectiva de estadios neurogénicos en el hipocampo. Análisis por RT-PCR semicuantitativa de marcadores de precursores neuronales (gfap, pcna, nestina y vimentina), neuronas inmaduras (dcx), células gliales (glast, cnpa y cd11b) y neuronas maduras (tuj1, ncam y calbindina) en hipocampos de animales sacrificados 24h después de la sesión de irradiación. Los valores de expresión (barras) están relativizados respecto a animales no irradiados, al cual se le asigna valor 1 (línea discontinua roja). N=5 por grupo. *, $P<0,05$; **, $P<0,01$.

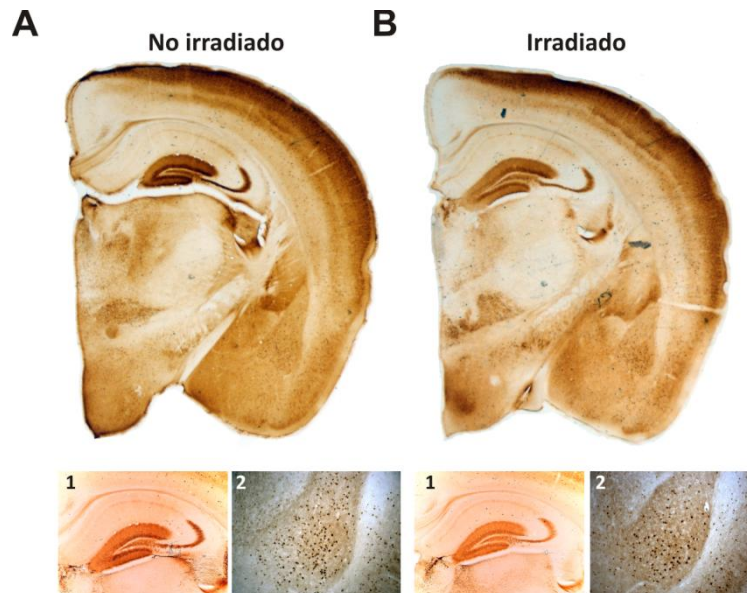


Figura 18. La irradiación con rayos X no produce alteraciones estructurales groseras. A y B, Imágenes representativas de la inmunoreactividad para calbindina en cortes coronales de cerebros de ratones no irradiados (A) e irradiados (B) sacrificados 6h después de la sesión de irradiación (hemisferio completo; 1, hipocampo y 2, amígdala). N=6 por grupo.

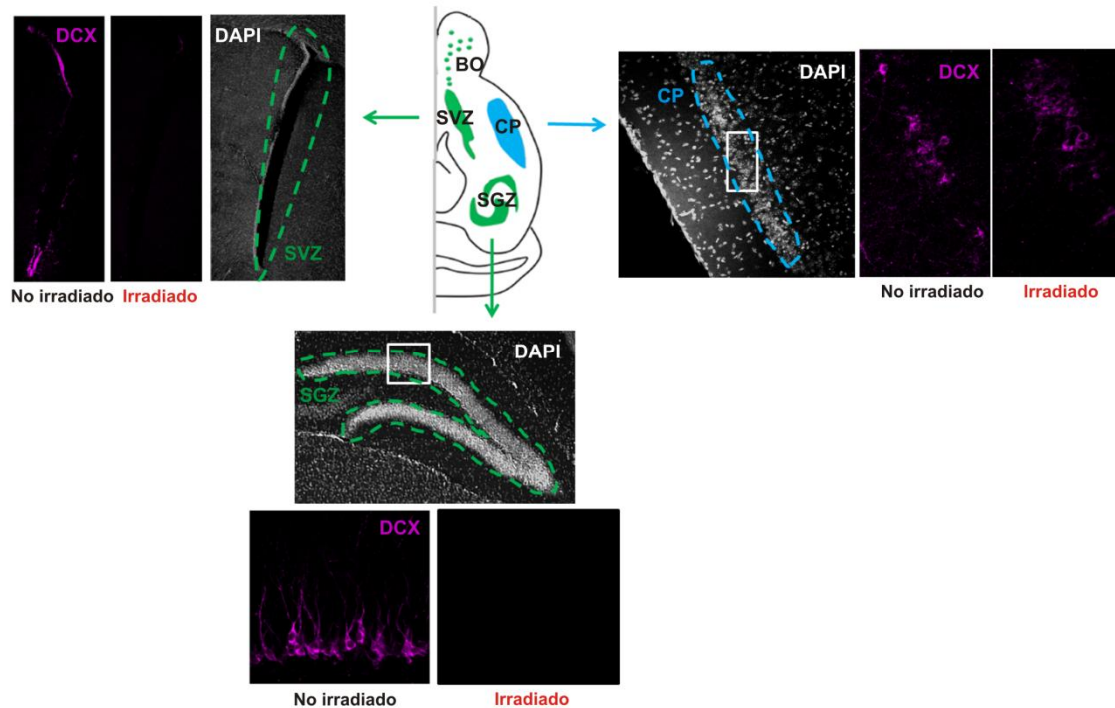
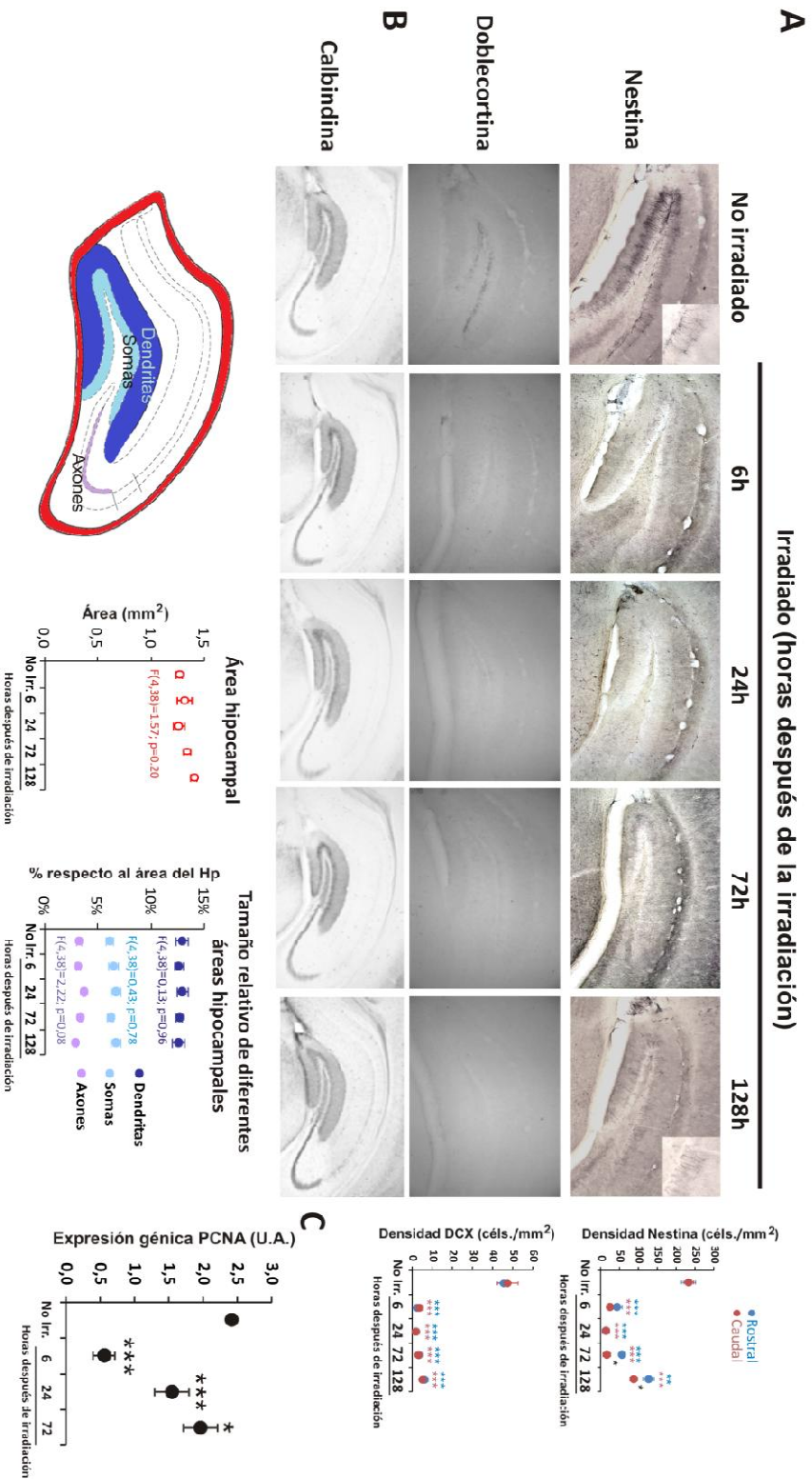


Figura 19. La irradiación con rayos X afecta selectivamente a los nichos neurogénicos. Esquema representativo de las zonas de expresión del marcador DCX, marcador de neurona inmadura en los nichos neurogénicos, zona subventricular y subgranular (SVZ y SGZ, en verde); y como marcador de neurona madura en la corteza piriforme (CP, en azul) en cerebro de ratón. Análisis por inmunofluorescencia de DCX en cortes coronales de cerebros de ratones no irradiados e irradiados sacrificados 6h después de la sesión de irradiación. N=6 por grupo. BO, bulbo olfativo.

Para caracterizar la duración del efecto de la irradiación, obtuvimos hipocampos de ratones sacrificados 6, 24, 72 y 128h después de la irradiación, y se analizó la expresión de Nestina, DCX, Calbindina y pcna (**Fig.20**). El curso temporal mostró una pérdida rápida de células positivas para Nestina o DCX a las 6-24h, con tendencia a la recuperación en el caso de la Nestina a las 128h, alcanzando el 50% de recuperación (**Fig.20A**), después de la irradiación. Estos datos sugirieron que la pérdida de neurogénesis adulta producto de la irradiación fue transitoria y podría indicar que la irradiación, no altera irreversiblemente los nichos neurogénicos. Este hecho se corroboró cuando se observó que el marcador de proliferación celular pcna caía a su mínimo de expresión a las 6h, recuperándose a las 72h tras la sesión de irradiación (**Fig.20C**). Cabe destacar que la recuperación celular se produjo de manera diferencial a lo largo del eje rostro-caudal; el hipocampo a nivel rostral presentó un aumento de porcentaje de precursores a tan solo 72h después de la sesión de irradiación (**Fig.20A**). Además, analizamos la integridad estructural y celular del GD de ratones irradiados frente a no irradiados. Durante la primera semana tras la irradiación no se produjeron cambios en el área hipocampal, ni en el área que ocupan las terminales axónicas, arborización dendrítica y somas de



las células granulares del GD (**Fig.20B**). Por otro lado, estudiamos las interneuronas del *hilus*, células muy relacionadas con la conectividad de giro dentado (**Fig.21A**). La inmunofluorescencia para marcadores de diferentes poblaciones de interneuronas (GAD67, Calretinina y Parvoalbúmina) en hipocampos de ratones no irradiados y sacrificados 24h tras la irradiación, reveló que ésta no altera el número de interneuronas del *hilus* (**Fig.21B**).

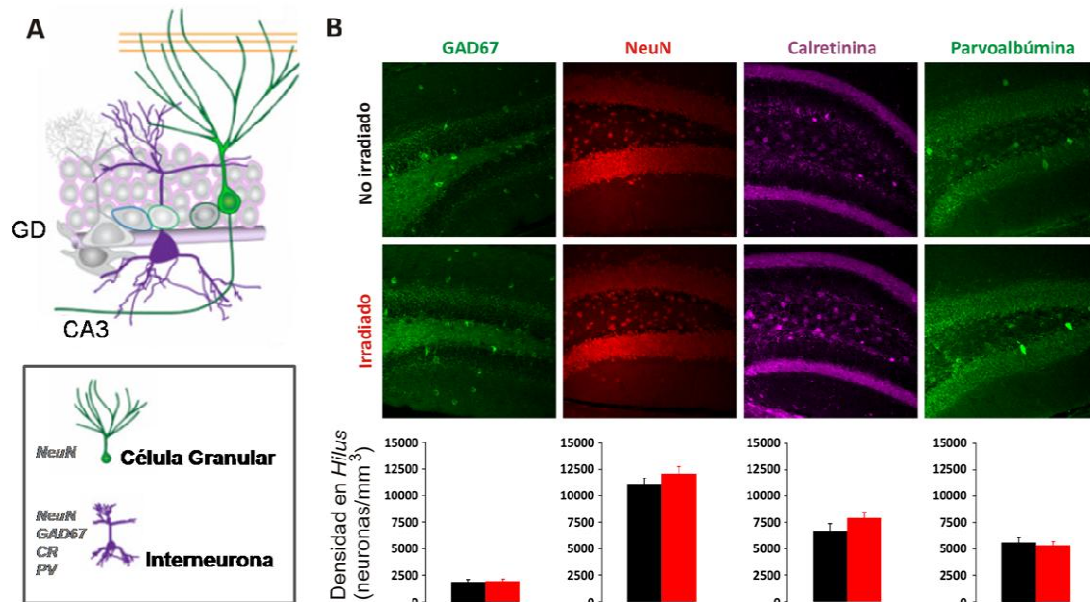


Figura 21. La irradiación con rayos X no afecta a las interneuronas del *hilus*. **A**, Esquema representativo de la relación de la neurogénesis hipocampal adulta con las interneuronas del *hilus* del GD, indicando los marcadores distintivos que expresan. **B**, Imágenes de inmunofluorescencia contra GAD67 (interneuronas gabaérgicas), NeuN (neuronas), Calretinina (población de interneuronas) y Parvoalbúmina (población de interneuronas) en cortes coronales de cerebros de ratones no irradiados (negro) y sacrificados 24h tras la irradiación (rojo). Los gráficos muestran la densidad de células del *hilus* (neuronas/mm³) positivas para los diferentes marcadores. N=7 por grupo.

Puesto que el protocolo de irradiación con rayos X afecta solo temporalmente a los distintos estadios neurogénicos adultos, evaluamos si la irradiación preservó la homeostasis basal en el tejido realizando una batería de expresión de marcadores inflamatorios (iba1, cd68, cx3cr, tnfa e il1β) en hipocampo de ratones no irradiados y sacrificados entre las 6 y 72h tras una sesión de irradiación. Aunque la expresión de tnfa presentó un ligero aumento transitorio, ninguno de estos marcadores se ven alterados significativamente con la irradiación. Además, la irradiación tampoco afectó a la expresión de caspasa3, marcador de muerte celular (**Fig.22**).

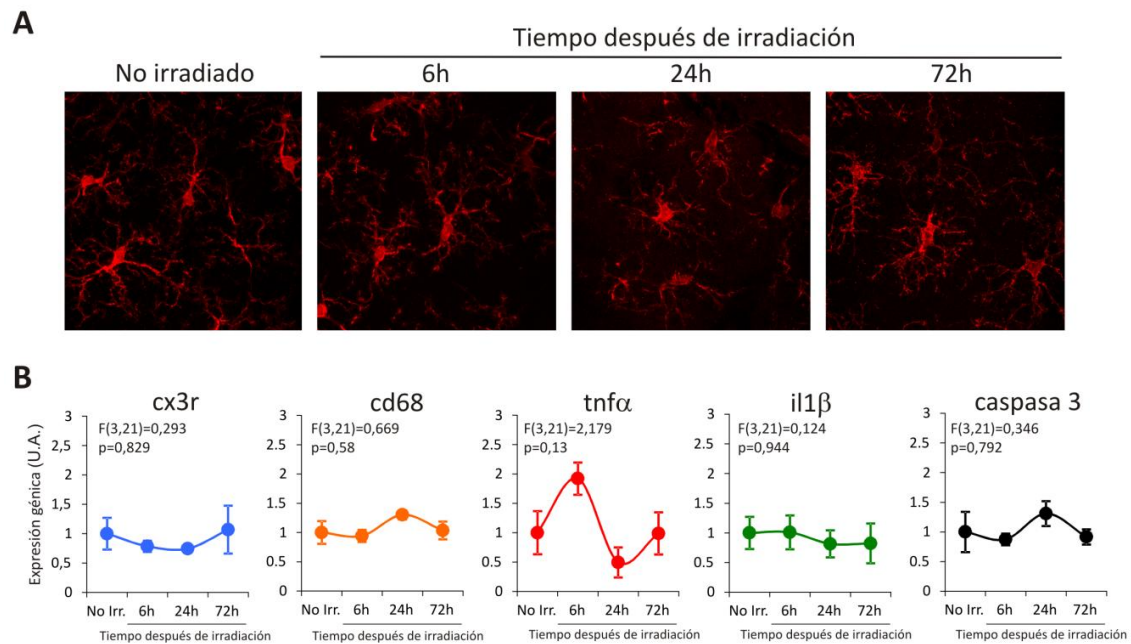


Figura 22. La irradiación con rayos X no provoca respuesta inflamatoria significativa en el hipocampo. A, Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra el marcador microglial Iba1 en hipocampos de ratones no irradiados y sacrificados 6, 24 y 72h después de una sesión de irradiación. **B,** Análisis de expresión génica por RT-PCR semicuantitativa de marcadores de activación microglial (cx3r, cd68, tnfa e il1 β) y muerte celular (caspa3) en hipocampos de ratones no irradiados y sacrificados 6, 24 y 72h después de una sesión de irradiación. N>5 para los grupos no irradiados y N=4-5 para cada uno de los grupos sometidos a irradiación.

1.2 Una única sesión de irradiación con rayos X en el animal despierto e inmovilizado no afecta a las capacidades sensoriomotoras de ratones adultos.

Una vez conseguida una ablación de neurogénesis adulta rápida, específica y no invasiva, quisimos comprobar que este protocolo nos permita estudiar comportamiento a muy corto plazo 3-4h después de la sesión de irradiación, requisito imprescindible para abordar nuestro objetivo final. Las capacidades sensoriomotoras de ratones no irradiados y 4h después de la irradiación, no manifestaron diferencias de actividad motora en un campo abierto (**Fig.23A**) ni de capacidad exploratoria y/o sensorial en la tarea de reconocimiento de objetos (**Fig.23B**). Estos datos demostraron que los ratones irradiados mantienen sus capacidades intactas para realizar tareas conductuales básicas.

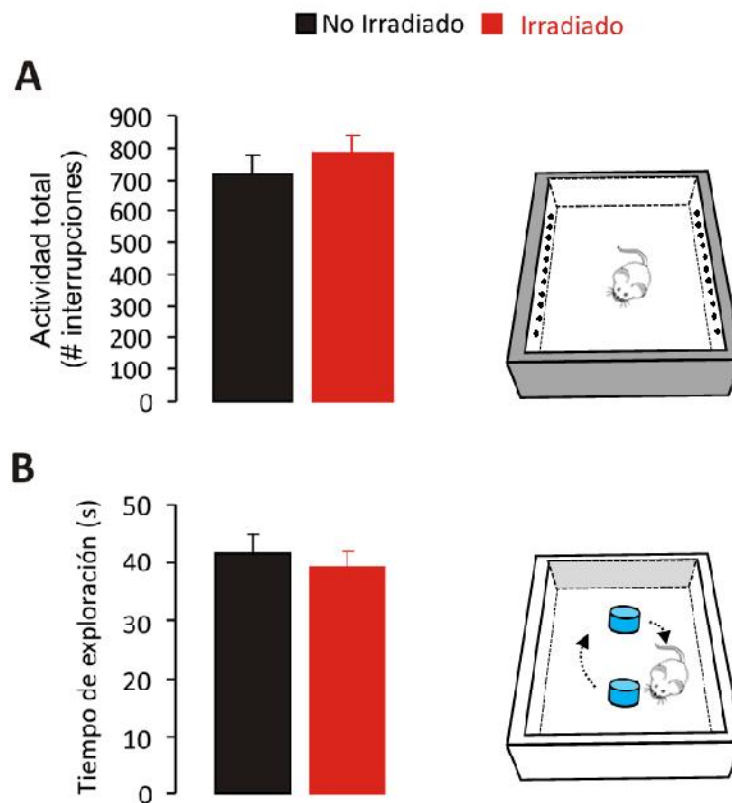


Figura 23. Las capacidades sensoriomotoras de los ratones no se ven afectadas a las 4h tras la sesión de irradiación con rayos X. A, La actividad motora fue evaluada en un campo abierto, como el número de interrupciones de los haces de luz infrarroja en una sesión de 15min. **B,** La exploración y capacidades sensoriales (visión y olfato) fueron evaluadas como el tiempo de exploración activa de dos objetos novedosos durante una sesión de 15min. N=5 por grupo.

1.3 Una única sesión de irradiación con rayos X no provoca alteraciones en las propiedades electrofisiológicas del hipocampo adulto.

Para evaluar el posible efecto de la irradiación del cerebro completo a todos los niveles, caracterizamos las propiedades electrofisiológicas del hipocampo *in vivo* en el ratón anestesiado. Para ello, registramos la actividad neuronal espontánea en el hipocampo con un electrodo multicanal (**Fig.24**). La actividad oscilatoria espontánea registrada en los canales correspondientes al GD y a la región CA1 de hipocampo fue analizada en diferentes bandas de frecuencia (delta, theta, alfa, beta y gamma), sin encontrar diferencias en la potencia espectral relativa de dichas bandas al comparar los ratones no irradiados con aquellos que fueron irradiados 24-48h antes de realizar la sesión de registro. Estos resultados indican que la irradiación no altera la actividad neuronal espontánea del hipocampo.

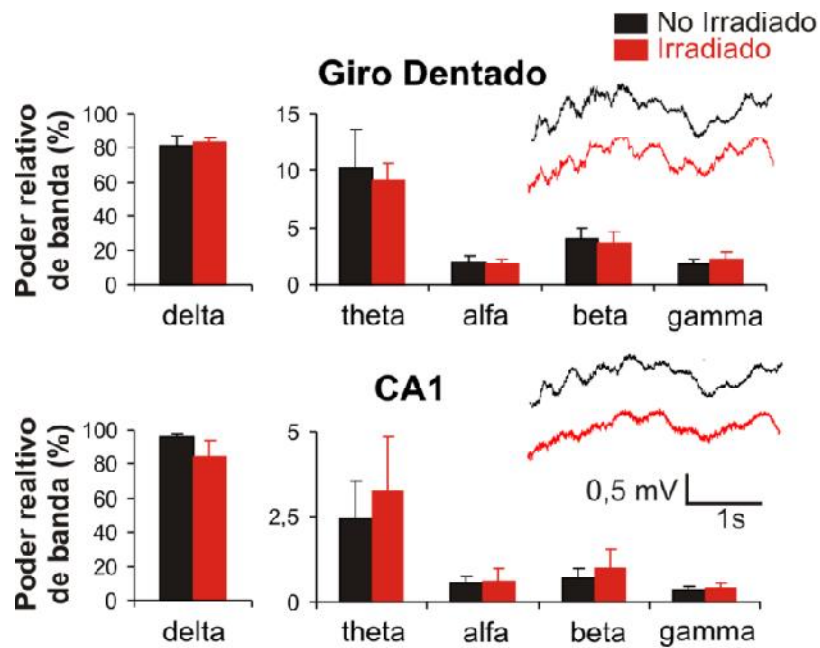


Figura 24. El protocolo de irradiación con rayos X para eliminar la neurogénesis adulta no afecta a la actividad eléctrica espontánea cerebral. Actividad electrofisiológica espontánea *in vivo* en la región de GD y CA1 de ratones anestesiados no irradiados (barras y trazos de registro en negro) e irradiados 24-48h previo al registro (barras y trazos de registro en rojo). Los histogramas representan la potencia relativa de la señal para bandas de frecuencia de oscilación de delta (0,5-4Hz), theta (4-8Hz), alfa (8-12Hz), beta (12-30Hz) y gamma (30-100Hz). También se muestran trazos representativos de los registros electrofisiológicos en *hilus* de GD y *stratum radiatum* de CA1 de ratones no irradiados frente a irradiados. N=5 por grupo.

A continuación, para realizar un estudio de las propiedades electrofisiológicas del circuito hipocampal, medimos la respuesta de campo, potenciales postsinápticos excitatorios (fEPSPs) de las células granulares de GD y CA1 y la espiga poblacional (PS) de las células granulares del GD, provocada por una estimulación de la vía perforante (PP) (**Fig.25A**). Un estímulo supraumbral en la vía perforante de ratones no irradiados genera un perfil electrofisiológico hipocampal típico: un fEPSP negativo en la capa molecular del GD, que representa la entrada monosináptica entorrinal (fEPSP-GD), seguido de una PS de las células granulares, cuya máxima amplitud se encuentra en el centro del *hilus*, y un fEPSP trisináptico en el *stratum radiatum* de la región de células piramidales CA1 (**Fig.25A**). Si el mismo estímulo se administra a ratones que fueron irradiados 24-48h antes, el perfil electrofisiológico hipocampal resultante es similar al obtenido en ratones no irradiados. Por otro lado, la estimulación de pulsos individuales con distintas intensidades de corriente (curva estímulo-respuesta), generaron respuestas evocadas similares, cualitativas o cuantitativas, en animales no irradiados e irradiados, lo cual sugiere que la irradiación no afecta a la transmisión basal ni a la excitabilidad de las células granulares del GD (**Fig.25B**).

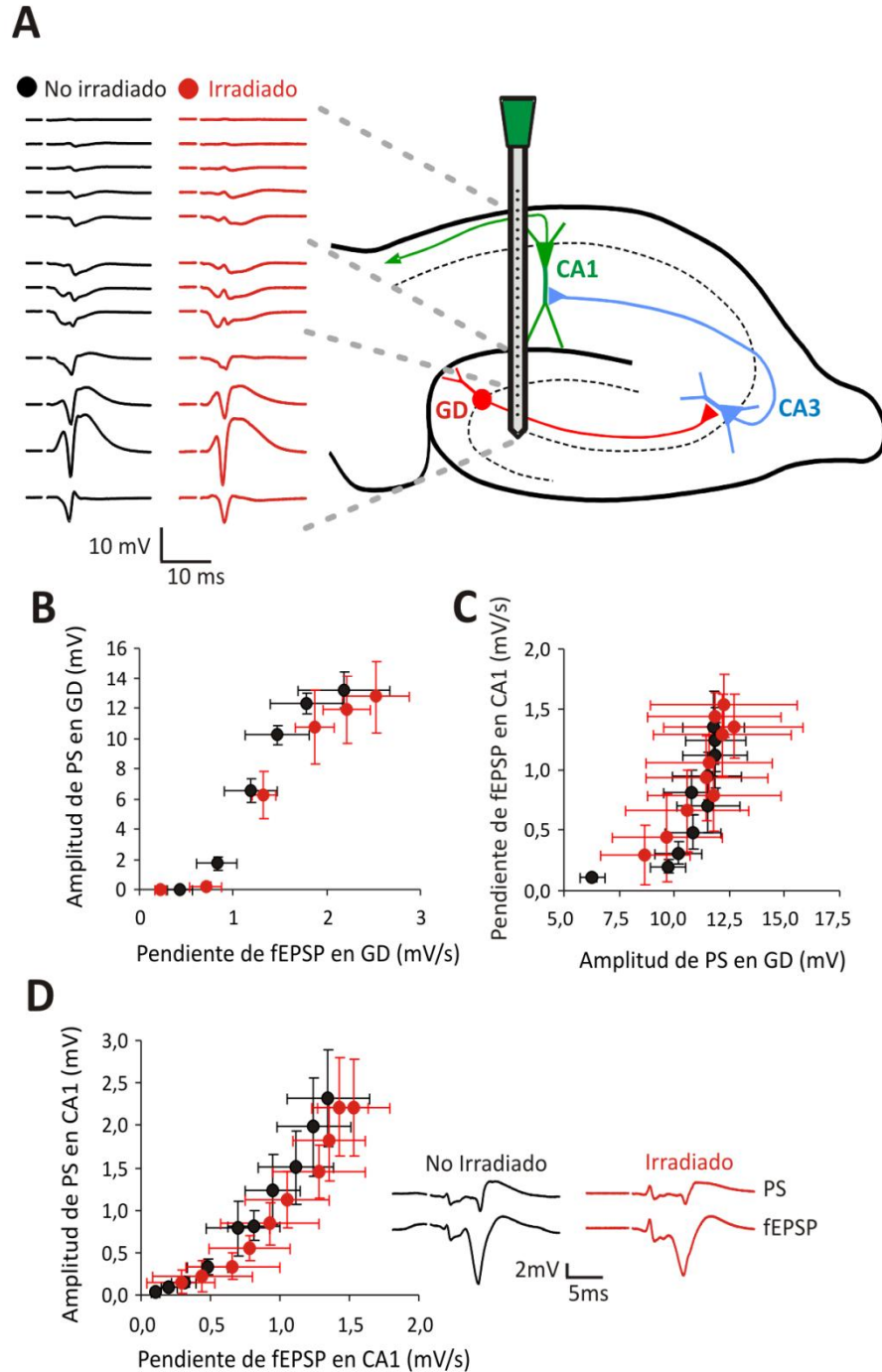


Figura 25. El protocolo de irradiación con rayos X elimina la neurogénesis adulta sin afectar a la actividad electrofisiológica evocada en hipocampo. **A**, Esquema del sistema de registro introducido en el hipocampo junto con los perfiles de potenciales de campo representativos a distintas alturas del hipocampo evocados por estimulación en la vía perforante en ratones no irradiados (trazos en negro) e irradiados (trazos en rojo). **B**, Análisis de excitabilidad de las células granulares representando fEPSP frente a PS evocada en GD tras estimulación de la vía perforante con pulsos simples a distintas intensidades (desde 50 hasta 1000 μ A) en ratones no irradiados (puntos en negro) e irradiados (puntos en rojo). **C**, Acoplamiento funcional entre GD y CA1, PS en GD frente fEPSP en CA1, debido a una estimulación con trenes de 1Hz en la vía perforante. **D**, Acoplamiento funcional en la región de CA1, fEPSP frente a PS, tras estimulación con trenes de 1Hz en la vía perforante. Se muestran registros trisinápticos (GD-CA3-CA1) representativos en CA1 tras estimulación en la vía perforante. N=6 para grupo no irradiado, N=5 para grupo irradiado.

Además, se estimuló la PP con trenes de 1Hz para determinar la conectividad intrahipocampal. La comparación de los PS-fEPSP evocados por los trenes de 1Hz en la vía perforante en GD y CA1, respectivamente, mostró que la conexión GD→CA1 permanece intacta en los animales irradiados (**Fig.25C**). Utilizando el mismo protocolo de estimulación, se comparó la relación fEPSP-PS en CA1 en animales no irradiados e irradiados (**Fig.25D**). Los resultados obtenidos indicaron que la transmisión basal y la excitabilidad neuronal en las neuronas piramidales de CA1 no se encuentran afectadas en los animales irradiados. Todos estos datos electrofisiológicos sugieren que el protocolo de ablación de neurogénesis adulta por irradiación con rayos X no perturba la actividad neuronal basal.

2. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA EN LA ADQUISICIÓN Y FORMACIÓN DE MEMORIAS, Y EN LOS CAMBIOS DE EFICIENCIA SINÁPTICA DURADEROS.

2.1. La neurogénesis hipocampal adulta participa en la adquisición de información y la formación de memorias duraderas en paradigmas que dependen del hipocampo.

El aprendizaje y la memoria son procesos complejos que pueden ser considerados como eventos que ocurren de manera secuencial: primero se adquiere la información para posteriormente almacenarla. El papel de las células inmaduras del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria se determinó empleando dos paradigmas de conducta que dependen del hipocampo: reconocimiento de objetos (RO) y evitación pasiva (EP) (Baarendse, 2008; Winters y col., 2008). Para determinar si la neurogénesis hipocampal adulta es necesaria para el aprendizaje, irradiamos 4h antes o justo después de la sesión de entrenamiento de RO y EP, y como índice de aprendizaje, se evaluó la memoria poco duradera (STM) 4h después de la sesión de entrenamiento. Los ratones irradiados mostraron índices de discriminación (ID) de objetos en la prueba de STM significativamente más bajos con respecto al obtenido en el grupo no irradiado ($ID=0,17\pm0,02$ y $-0,05\pm0,03$ para ratones no irradiados e irradiados 4h antes de la sesión de entrenamiento [$t(9)=5,25$; $P<0,001$]; e $ID=0,19\pm0,02$ y $0,00\pm0,04$ para ratones no irradiados e irradiados justo después de la sesión de entrenamiento [$t(9)=3,86$; $P=0,003$]). Igualmente, las latencias de escape en la prueba de STM en EP fueron significativamente inferiores a las obtenidas por ratones no irradiados (latencias de escape = $51,55\pm8,85s$ y $28,03\pm3,73s$ para ratones no irradiados e irradiados 4h antes de la sesión de entrenamiento [$t(15)=2,59$; $P=0,02$]; y latencias de escape = $59,81\pm11,16s$ y $16,86\pm2,44s$ para ratones no irradiados e irradiados justo después de la sesión de entrenamiento [$t(9)=3,04$; $P=0,008$]) (Fig. 26A, Tabla 4).

Para investigar si las células inmaduras adultas participan en la formación de memorias duraderas (consolidación), irradiamos después de una sesión de STM realizada 1h después de la sesión de entrenamiento. A continuación, realizamos pruebas de retención de la memoria (LTM), 24h

después en RO y 72h después en EP (**Fig.26B, Tabla 4**). Comparando con ratones no irradiados, los índices de consolidación de los ratones irradiados justo después de la sesión de STM en ambos paradigmas fueron significativamente bajos ($ID=0,18\pm0,03$ y $0,01\pm0,03$ para ratones no irradiados e irradiados en RO respectivamente [$t(9)=3,17$; $P=0,01$]; e $ID=71,14\pm11,65s$ y $24,25\pm1,85s$ para ratones no irradiados e irradiados en EP respectivamente [$t(11)=4,40$; $P=0,001$]). Para demostrar que las deficiencias cognitivas encontradas sólo ocurren en tareas que dependen del hipocampo, estudiamos el aprendizaje y la formación de memoria en una tarea motora que no depende del hipocampo: el rotarod. En esta prueba motora no obtuvimos diferencias significativas en el aprendizaje y consolidación entre ratones no irradiados e irradiados antes de la primera sesión de entrenamiento (**Fig.26C**). Todos estos resultados sugieren que la neurogénesis hipocampal adulta participa en la adquisición y consolidación de información que depende del hipocampo.

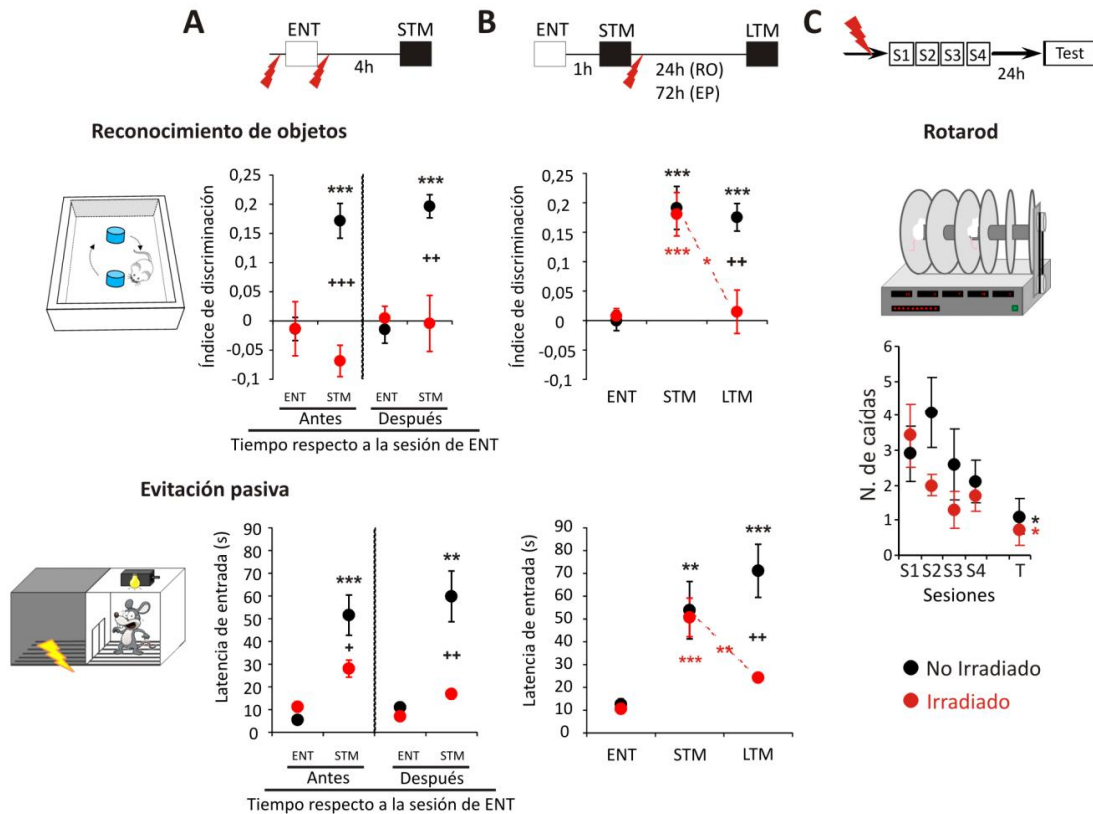


Figura 26. La neurogénesis hipocampal adulta es requerida para el aprendizaje y consolidación de memorias que dependen del hipocampo. **A**, La irradiación con rayos X antes y justo después de la sesión de entrenamiento de RO y EP provoca un déficit de memoria poco duradera (STM, índice de aprendizaje) evaluada 4h después de la sesión de entrenamiento. **B**, La irradiación con rayos X después de una sesión de evaluación de memoria, realizada 1h tras la sesión de entrenamiento, bloquea el establecimiento de memoria duradera de RO y EP (LTM, índice de consolidación), evaluada 24 y 72h después de la sesión de entrenamiento para RO y EP, respectivamente. **C**, La ablación de neurogénesis adulta no afecta a la adquisición y consolidación de un aprendizaje motor. * representa la diferencia significativa entre sesión de evaluación de memoria y la sesión de entrenamiento o entre sesiones de evaluación de memoria (STM o LTM) para ratones no irradiados y para irradiados; + representa la diferencia significativa entre grupos en la misma sesión. *, $P<0,05$; **, $P<0,01$; y ***, $P<0,001$.

Tabla 4. Tiempo de exploración de los objetos (segundos) por sesión en los experimentos conductuales de reconocimiento de objetos del bloque 2 de resultados.

	Sesiones			
Experimento	ENT (Entrenamiento)	STM (Aprendizaje)	LTM (Consolidación)	n
Fig. 11A. Papel de la neurogénesis en aprendizaje				
No irradiado	42±5,32	36.4±2,69	--	5
Irradiado 4h antes del ENT	39,2±4,62	35,8±6,16	--	5
No irradiado	55±12,19	33,6±7,61	--	5
Irradiado justo después del ENT	56,5±9,08	36,5±3,23	--	5
Fig. 11B. Papel de la neurogénesis en la formación de memoria duradera				
No irradiado	104,8±10,38	69±6,19	50,75±4,53	5
Irradiado justo después de la STM	101±5,45	58,8±7,16	41±1,47	5
Fig. 12A. Requerimiento temporal de la neurogénesis para la formación de memoria duradera				
No irradiado	75,2±5,04	--	41,8±3,27	5
Irradiado 24h después del ENT	69±4,48	--	40,8±3,27	5
Irradiado 48h después del ENT	61,5±8,39	--	44,25±4,55	5
Irradiado 72h después del ENT	77±7,43	--	39,2±4,69	5
Fig. 12C. Dependencia del hipocampo del proceso de consolidación 72h después del entrenamiento				
No tratado	93,5±18,25	--	58,83±15,78	6
TTX/CNQX	109,66±16,1	--	46,5±12,46	6

n, número de ratones por grupo; ENT, sesión de entrenamiento; STM, sesión de evaluación de memoria poco duradera; LTM, sesión de evaluación de memoria duradera.

2.2. La formación de memorias de reconocimiento de objetos y evitación pasiva requieren distinta demanda temporal de la neurogénesis hipocampal adulta.

Aunque ambos paradigmas empleados, RO y EP, dependen del hipocampo, son paradigmas de diferente complejidad e implicación emocional. Por ello, hemos evaluado si la relación temporal entre la neurogénesis hipocampal adulta y el proceso de formación de memorias duraderas de RO y EP es diferente. Para estudiar el proceso de consolidación en RO se evaluó la retención de información (LTM) 3d después de la sesión de entrenamiento, en ratones que fueron irradiados 24, 48 o 72h después de la sesión de entrenamiento. Los ratones irradiados 24 o 48h después de la sesión de entrenamiento muestran una consolidación deficiente de la información en comparación con ratones no irradiados ($ID=0,25\pm0,04$ y $0,00\pm0,05$ para ratones no irradiados e irradiados 24h después de la sesión de entrenamiento [$t(9)=3,63$; $P<0,005$]; e $ID=0,21\pm0,05$ y $0,05\pm0,02$ para ratones no irradiados e irradiados 48h después de la sesión de entrenamiento [$t(9)=2,50$; $P<0,03$]) (**Fig.27A**, **Tabla4**). Sin embargo, los ratones irradiados 72h después de la sesión de entrenamiento y 4h antes de la sesión de evaluación de retención de información, mostraron un ID de objetos similar al de ratones no irradiados. Para el estudio en EP se adoptó un enfoque similar, pero en este caso la retención duradera de memoria se evaluó 8días después de la sesión de entrenamiento y se establecieron grupos de irradiación 5, 6 o 7días después de la sesión de entrenamiento. En contraste con los resultados obtenidos en RO, los ratones irradiados 5 o 6días después de la sesión de entrenamiento mostraron bajos índices de consolidación en comparación con el de ratones no irradiados (latencias de escape = $53,03\pm8,82s$ y $14,64\pm3,29s$ para ratones no irradiados e irradiados 5días después de la sesión de entrenamiento [$t(9)=3,52$; $P=0,006$]; y latencias de escape = $59,62\pm0,38s$ y $11,47\pm1,91s$ para ratones no irradiados e irradiados 6días después de la sesión de entrenamiento [$t(9)=11,72$; $P<0,001$]) (**Fig.27B**). Es importante destacar que cuando los ratones fueron irradiados 7días después de la sesión de entrenamiento no hubo diferencias con respecto a ratones no irradiados.

Todos estos resultados sugieren que la formación de memorias de EP requiere un mayor periodo de dependencia de la neurogénesis hipocampal adulta que la de RO. Sin embargo, no podemos descartar si estos procesos de memoria a sus respectivos tiempos, 3días para RO u 8días para EP, ya fueran independientes de hipocampo. Para resolver esta cuestión, inhibimos farmacológicamente la actividad hipocampal mediante la administración local bilateral de un cóctel de antagonistas neuronales (TTX/CNQX) a nivel dorsal y ventral 30min antes de la sesión de evaluación de retención de información (LTM) en RO (**Fig.27C**) y EP (**Fig.27D**). En ambos casos, se produjo el bloqueo

de la recuperación de la información en la prueba de consolidación, lo cual evidencia que el proceso a dichos tiempos depende de hipocampo, aunque independiente de la neurogénesis hipocampal adulta.

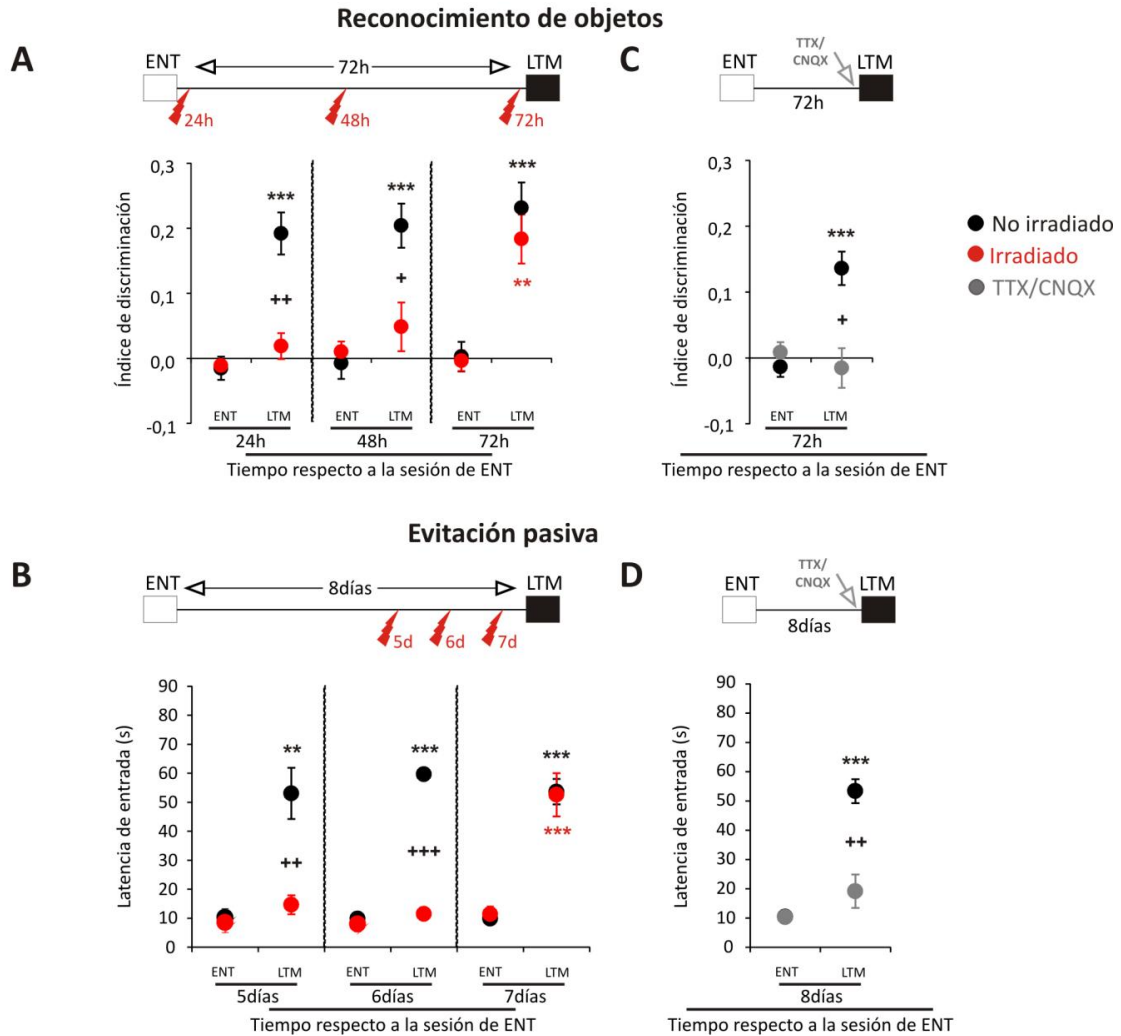


Figura 27. La formación de memoria duradera en reconocimiento de objetos y evitación pasiva requiere de las neuronas inmaduras adultas durante diferentes tiempos. A y B, Dependencia temporal de la neurogénesis hipocampal adulta en la formación de memoria duradera de RO (A) y EP (B). El curso temporal de irradiación con rayos X aplicado para cada paradigma se muestra en el esquema superior de las respectivas gráficas. **C y D,** Papel funcional del hipocampo en el momento de la sesión de evaluación de la retención de memoria por administración de un cóctel de TTX/CNQX. * representa la diferencia significativa entre sesión de evaluación de memoria y la sesión de entrenamiento para ratones no irradiados e irradiados, o inyectados; + representa la diferencia significativa en la misma sesión. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ y ***, $P < 0,001$.

2.3. La inducción de potenciación sináptica duradera requiere de la neurogénesis hipocampal adulta.

Cambios en la eficiencia sináptica de larga duración parecen ser necesarios para el aprendizaje y la memoria (Daoudal y Debanne, 2003; Gruart y col., 2006; Clarke y col., 2010). Como la ablación de neurogénesis causa problemas cognitivos quisimos saber la incidencia de la ausencia de estadios neurogénicos en el hipocampo en la plasticidad sináptica duradera de los circuitos de esta área. Para inducir cambios de la eficiencia sináptica duradera, en este caso potenciación sináptica duradera (LTP), realizamos un protocolo de estimulación con trenes de alta frecuencia administrada en la frecuencia de banda theta (TBS, del inglés “theta burst stimulation”) en la vía perforante (PP) y registramos con un electrodo multicanal en las distintas capas del hipocampo en el ratón anestesiado no irradiado e irradiado 24-48h antes de la sesión de registro.

Para monitorizar los cambios de eficiencia sináptica tomamos como referencia el valor de la pendiente del fEPSP de las células piramidales de CA1 (**Fig.28D**) y de las células granulares de GD (**Fig.28B**), y la amplitud de la PS de las células granulares en la región del *hilus* (**Fig.28C**). Para tomar el valor basal de referencia de todos estos parámetros y comprobar la estabilidad del sistema de registro, se realizó 15min de registro donde pulsos individuales con una intensidad fija, del 50% de la intensidad necesaria para provocar un máximo de respuesta sináptica, fueron administrados a la PP cada 20s. Tras esta línea base, se administró la TBS y posteriormente, registramos durante 2h la evolución de los parámetros seleccionados del mismo modo que para el registro de la línea base. En animales no irradiados, el protocolo de TBS generó una robusta LTP que duró al menos 2h, con un incremento de más del 50% respecto a la línea base en todas las áreas seleccionadas. En el caso de los ratones que carecen de neurogénesis hipocampal adulta se produjo un leve incremento, aunque no significativo, de la eficiencia sináptica inmediatamente después de la administración de TBS, que decreció a los niveles basales transcurridas 2h de la TBS. Por último, y como control de nuestros registros electrofisiológicos, se comprobó que el estado de anestesia de los ratones al inicio y al final de la sesión de registro fue similar. El análisis espectral de la actividad oscilatoria espontánea mostró similar potencia espectral en todas las bandas del espectro en ambas áreas al principio y final de la sesión de registro (**Fig. 29**). Estos resultados sugieren que la neurogénesis hipocampal adulta es requerida para el establecimiento de LTP en el hipocampo.

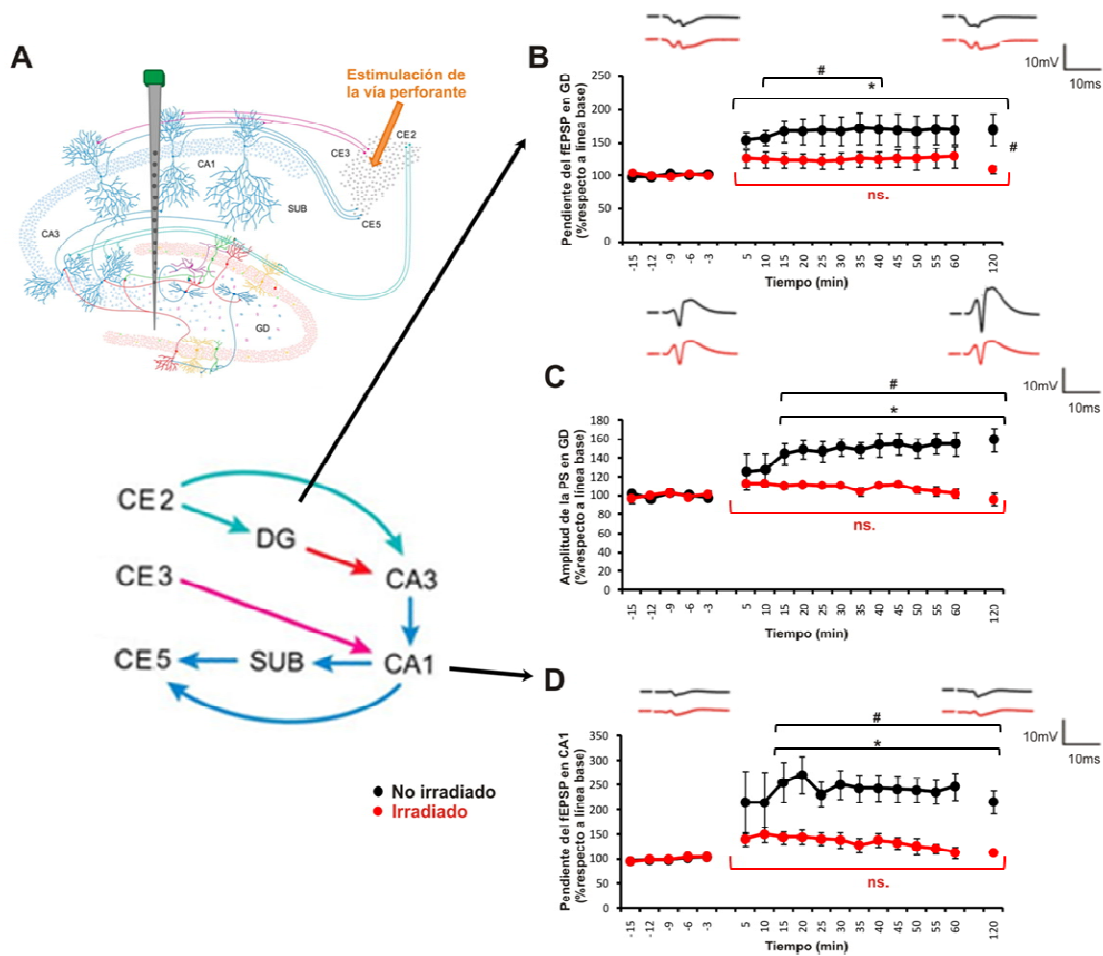
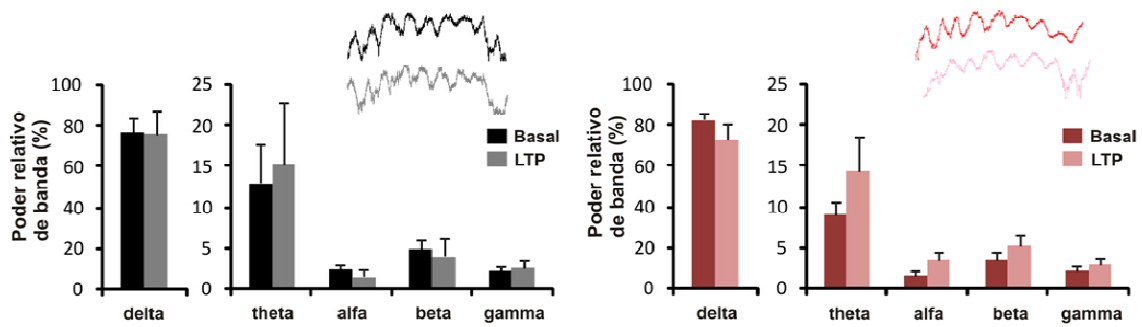


Figura 28. La neurogénesis hipocampal adulta es requerida para la inducción de cambios de eficiencia sináptica duradera (LTP). **A**, Esquema de una sección de hipocampo de ratón mostrando las principales poblaciones neuronales, áreas y proyecciones. Además, se representa el montaje experimental para el registro multicanal *in vivo*. El electrodo de estimulación se colocó en la vía perforante mientras que el electrodo multicanal cruzaba todas las capas del hipocampo. **B-D**, Monitorización del cambio de la pendiente del fEPSP en las capas somatodendríticas de células granulares (**B**) y neuronas piramidales de CA1 (**D**) o la amplitud de la espiga poblacional en el *hilus* (**C**) durante la línea base y hasta 2h después de la administración de la TBS en ratones no irradiados (trazos en negro) e irradiados 24-48h antes del registro (trazos en rojo). Sobre el gráfico se muestran trazos representativos del registro. GD, giro dentado; SUB, subículo; CE, corteza entorrinal. * representa la diferencia significativa con respecto a la línea base; # representa la diferencia significativa entre grupos. ns, no significativo. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ y ***, $P < 0,001$. $N=5$ por grupo.

Giro dentado



CA1

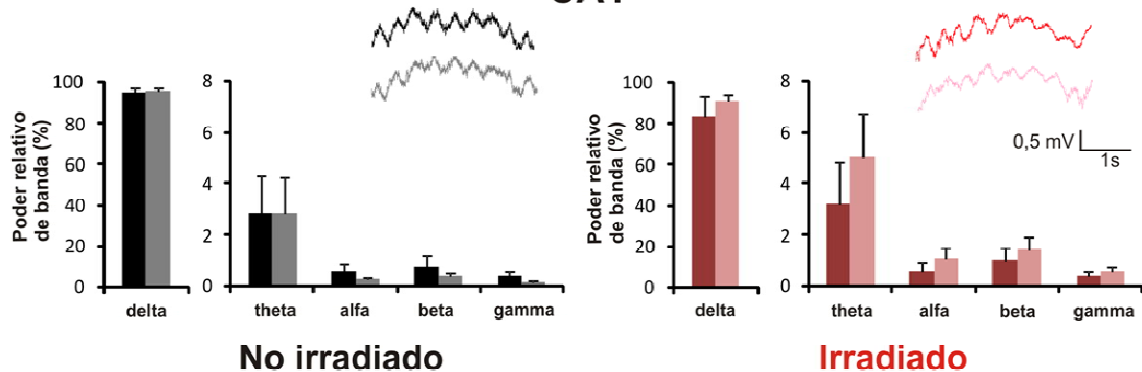


Figura 29. La actividad espontánea cerebral no se ve alterada durante la sesión de registro en ratones no irradiados ni en ratones irradiados con rayos X. Actividad electrofisiológica espontánea *in vivo* en la región de giro dentado y CA1 de ratones anestesiados no irradiados (barras y trazos de registro en negro) e irradiados (barras y trazos de registro en rojo) antes (barras y trazos oscuros) y 2h después (barras y trazos claros) de la administración de la TBS. Los histogramas representan la potencia espectral de la señal para bandas de frecuencia de oscilación representativas (delta 0,5-4Hz, theta 4-8Hz, alfa 8-12, beta 12-30Hz y gamma 30-100Hz) y trazos representativos de los registros electrofisiológicos en todas las condiciones y áreas. N=5 por grupo.

3. PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA EN LA MODIFICACIÓN DE MEMORIAS.

3.1. La neurogénesis hipocampal adulta participa únicamente en la actualización de memorias ya almacenadas.

Una vez estudiado el papel de la neurogénesis hipocampal adulta en el aprendizaje y consolidación de nuevas memorias que dependen del hipocampo, quisimos conocer si las neuronas inmaduras participan en la modificación de memorias ya almacenadas o lo que es lo mismo en el proceso de reconsolidación. Las memorias consolidadas son maleables, susceptibles de actualización, fortalecimiento o incluso pérdida debido a nuevas experiencias. De hecho, la eficiencia de la recuperación de memorias consolidadas muestra una disminución dependiente del tiempo, aunque no llega a la pérdida de la información en el marco temporal en el cual realizamos nuestros experimentos (**Fig.30, Tabla 5**).

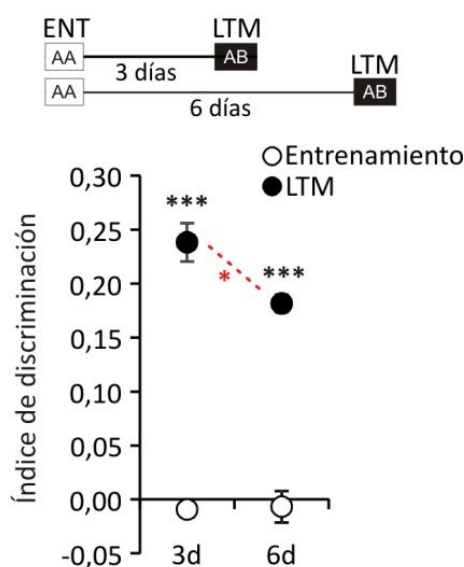


Figura 30. Disminución con respecto al tiempo de la eficiencia de recuperación de memorias de reconocimiento de objetos. Estudio del índice de consolidación de memorias de reconocimiento de objetos 3 y 6 días después de la sesión de entrenamiento. * representa la diferencia significativa entre sesión de evaluación de memoria y la sesión de entrenamiento (en negro) o entre sesiones de evaluación de memoria (en rojo). *, $P < 0,05$ y ***, $P < 0,001$.

Para estudiar el proceso de reconsolidación de memorias de RO, los ratones fueron sometidos a una sesión de entrenamiento (ENT), en la cual se dejaron durante 15min en un recinto que contiene dos objetos iguales (AA). Tres días más tarde, se llevó a cabo una sesión de 10min de reactivación (RA)

y después de otros 3 días, se realizó una prueba de memoria (PR-LTM, del inglés “postreactivation long-term memory”) como medida de reconsolidación (Fig.31, Tabla5). En paralelo a grupos no irradiados, se realizaron los mismos experimentos con sesiones de irradiación para la ablación de la neurogénesis adulta 4h después de las respectivas sesiones de reactivación.

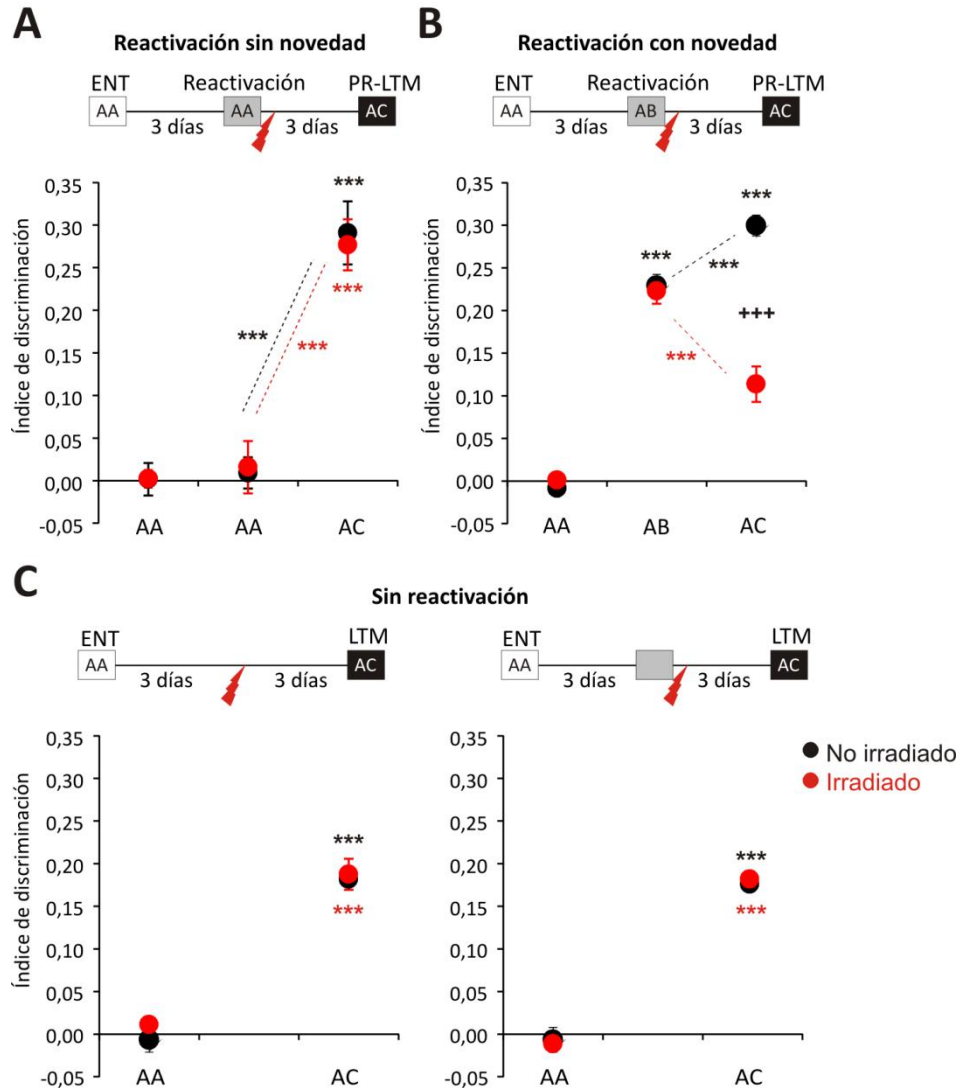


Figura 31. La neurogénesis hipocampal adulta es requerida para la actualización de memorias ya almacenadas. Efecto de la ablación de neurogénesis adulta en la reconsolidación de memorias de RO. Se comparó la reconsolidación en ratones no irradiados (en negro) e irradiados (en rojo) en tres circunstancias distintas: **A**, reactivación sin novedad; **B**, reactivación con novedad; y **C**, sin reactivación o tras la exploración de la arena sin objetos. La irradiación se realizó tras la sesión de reactivación si la hubo o bien 3 días después del entrenamiento si no se realizó reactivación. En cada gráfico: las letras A, B y C representan los diferentes objetos utilizados; ENT, sesión de entrenamiento; (PR)LTM, sesión de retención de memoria tras entrenamiento o tras reactivación (PR, postreactivation) ; * representa la diferencia significativa entre sesión de evaluación de memoria y la sesión de entrenamiento (ENT-Reactivación o ENT-(PR)LTM) o entre sesiones de evaluación de memoria (Reactivación-(PR)LTM) para ratones no irradiados en negro y para irradiados en rojo; + representa la diferencia significativa entre grupos en las distintas sesiones. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; y ***, $P < 0,001$.

Cuando en la RA se utilizaron los mismos objetos que en ENT, no se obtuvo diferencias en los índices de discriminación (ID) de objetos entre ENT y RA tanto en ratones no irradiados como irradiados. Además, los ratones irradiados mostraron índices de reconsolidación similares a los de ratones no irradiados ($0,29 \pm 0,04$ y $0,27 \pm 0,03$ para ratones no irradiados e irradiados respectivamente [$t(13)=0,54$; $P=0,58$]; **Fig.31A**). Por el contrario, cuando se incorporó un objeto novedoso a RA, los ratones irradiados mostraron un índice de reconsolidación bajo con respecto a ratones no irradiados ($ID=0,29 \pm 0,01$ y $0,11 \pm 0,02$ para ratones no irradiados e irradiados respectivamente [$t(17)=8,23$; $P<0.001$]; **Fig.31B**). Por último, cuando los ratones fueron irradiados 3 días después de ENT sin RA o tras una exploración de la arena sin objetos, no se produjo un deterioro de la retención de información ($ID=0,18 \pm 0,0$ y $0,18 \pm 0,02$ para ratones no irradiados e irradiados respectivamente [$t(18)=0,61$; $P=0,54$]; $DI=0,19 \pm 0,01$ y $0,19 \pm 0,00$ para ratones no irradiados e irradiados tras exploración respectivamente [$t(11)=0,46$; $P=0,64$] (**Fig.31C**). Estos resultados indican que el efecto de la irradiación sobre el proceso de reconsolidación requiere de la sesión de reactivación de la información, y que la neurogénesis hipocampal adulta sólo participa cuando la reactivación se realiza con novedad.

3.2 El proceso de reconsolidación con novedad requiere de la neurogénesis hipocampal adulta con la misma demanda temporal que el proceso de consolidación de memorias de reconocimiento de objetos.

Una vez comprobado que las neuronas inmaduras adultas están implicadas en la actualización de información ya almacenada, quisimos conocer la relación temporal entre el proceso de reconsolidación de RO y la neurogénesis hipocampal adulta. Para ello, se estudió la reconsolidación de información de RO utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente, pero irradiando 24, 48 o 72h después de la sesión de reactivación con novedad (**Fig.32A, Tabla 5**). Los ratones que fueron irradiados 24 o 48h después de la sesión de RA mostraron índices de reconsolidación bajos comparados con ratones no irradiados ($ID=0,3 \pm 0,01$, $0,12 \pm 0,02$ y $0,14 \pm 0,02$ para ratones no irradiados e irradiados 24 y 48h después de la reactivación respectivamente [$t(16)=6,81$ y $6,83$ para las comparaciones entre ratones no irradiados e irradiados 24 y 48h después de la reactivación respectivamente; $P<0,001$ en ambos casos]), mientras que el índice de reconsolidación de ratones irradiados 72h después de la RA fue similar a la de ratones no irradiados [$t(16)=0,53$; $P=0,62$].

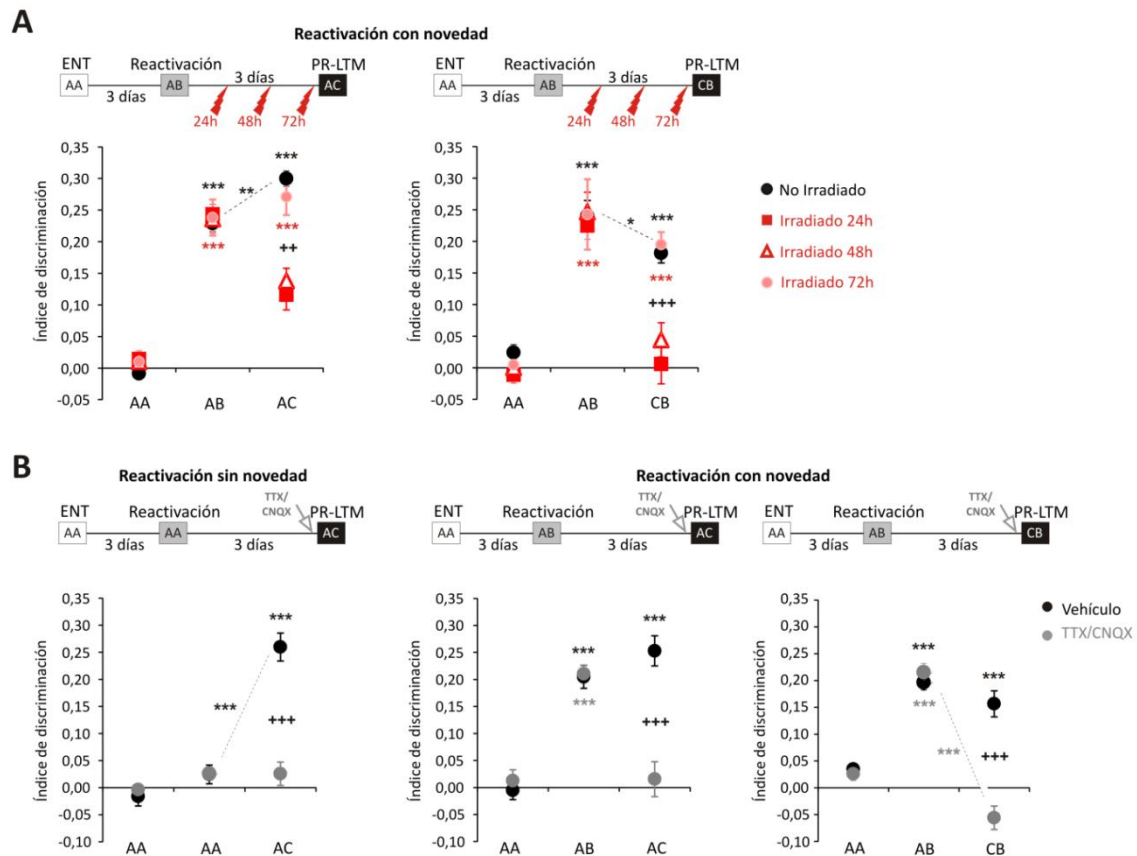


Figura 32. Dependencia temporal de las neuronas inmaduras adultas en la actualización de memorias de reconocimiento de objetos. A, Requerimiento temporal de la neurogénesis hipocampal adulta en la actualización de memorias ya almacenadas. El curso temporal de irradiación con rayos X aplicado para cada paradigma, con diferente combinación de objetos, se muestra en el esquema superior de las respectivas gráficas. **B,** Papel funcional del hipocampo en el momento de la sesión de evaluación de la retención de memoria tras reactivación de memorias de RO, sin o con novedad, por administración local de un cóctel de TTX/CNQX. En cada gráfico: las letras A, B y C representan los diferentes objetos utilizados; ENT, sesión de entrenamiento; (PR)LTM, sesión de retención de memoria tras entrenamiento o tras reactivación (PR, postreactivation); * representa la diferencia significativa entre sesión de evaluación de memoria y la sesión de entrenamiento (ENT-Reactivación o ENT-(PR)LTM) o entre sesiones de evaluación de memoria (Reactivación-(PR)LTM) para ratones no irradiados en negro y para irradiados en rojo; + representa la diferencia significativa entre grupos en las distintas sesiones. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; y ***, $P < 0,001$.

Para estudiar si la sesión de reactivación con novedad generó un nuevo almacenamiento de información, se realizó el mismo experimento pero evaluando la reconsolidación (PR-LTM) con el nuevo objeto utilizado en la sesión de reactivación (ahora familiar) y un nuevo objeto (**Fig.32A, Tabla 5**). Usando este protocolo, los ratones no irradiados prefirieron explorar el objeto nuevo. Para conocer el requerimiento temporal de neurogénesis en este nuevo protocolo, se irradió con rayos X 24, 48 o 72h después de la sesión de reactivación. Como sucedió anteriormente, los ratones que fueron irradiados 24 o 48h después de la sesión de reactivación muestran una reconsolidación deficiente comparada con la de ratones no irradiados, mientras que el índice de

reconsolidación mostrado por los ratones irradiados 72h tras la reactivación es similar al de ratones no irradiados ($ID=0,19\pm0,01$, $0,12\pm0,02$, $0,04\pm0,02$ y $0,18\pm0,01$ para ratones no irradiados e irradiados 24, 48 y 72h después de la reactivación respectivamente [$t(14)=5,82$, $5,17$ y $0,29$ para las comparaciones entre ratones no irradiados e irradiados 24, 48 y 72h después de la reactivación respectivamente; $P<0,001$ para las dos primeras comparaciones y $P=0,72$ para la última comparación]. El efecto diferencial de las irradiaciones a distintos tiempos con respecto a la RA, en sus distintas versiones, no es achacable a variaciones en tiempos de exploración de objetos (**Tabla 5**).

Estos resultados sugieren que la reconsolidación con novedad de memorias de reconocimiento de objetos ya consolidadas, al igual que el proceso de consolidación, requiere de la neurogénesis hipocampal adulta durante al menos 3días después de la sesión de reactivación.

Sin embargo, cabe la posibilidad de que el proceso de reconsolidación a dicho tiempo sea ya independiente de hipocampo. Para resolver esta cuestión, bloqueamos la actividad del hipocampo por la administración local de un cóctel TTX/CNQX 30min antes de la prueba de evaluación de la reactivación (**Fig.32B**). La administración farmacológica redujo en todos los casos los índices de reconsolidación, lo cual evidencia que este proceso aun es dependiente del hipocampo 3días después de la sesión de reactivación.

Tabla 5. Tiempo de exploración de los objetos (segundos) por sesión en los experimentos conductuales de reconocimiento de objetos del bloque 3 de resultados.

	Sesiones			
Experimento	ENT (Entrenamiento)	RA (Reactivación)	PR-LTM (Reconsolidación)	n
Fig. 17. Comparación del proceso de consolidación a 3 y 6días después del entrenamiento				
Control con LTM a los 3días del ENT	122±12,14	--	76,4±7,2	5
Control con LTM a los 6días del ENT	108,5±6,3	--	68,7±6,03	7
Fig. 18A. Papel de la neurogénesis en la reconsolidación de memoria sin novedad				
No irradiado	118±4,1	61,2±8,5	82,4±4,7	5
Irradiado justo después de la RA	119,4±7,2	67,8±3,7	76,4±4,6	5

Fig. 18B. Papel de la neurogénesis en la reconsolidación de memoria con novedad				
No irradiado	112,5±5,2	70,6±4,9	64,4±4,5	8
Irradiado justo después de la RA	124,2±6,2	67,2±3	60,4±3,1	8
Fig. 18C. Estudio del efecto de la irradiación en el proceso de consolidación a 6 días después del entrenamiento				
No irradiado	106,83±7,59	--	56,16±5,23	12
Irradiado 3 días después del ENT	128,2±7,75	--	54,2±7,59	7
No irradiado y sesión de exploración	129,33±4,01	--	50,16±3,17	6
Irradiado tras sesión de exploración	125,5±4,25	--	40,33±2,07	6
Fig. 19A. Requerimiento temporal de la neurogénesis para la reconsolidación con novedad (PR-LTM tipo AC)				
No irradiado	116,8±4,6	76,2±7,9	71,2±6,7	6
Irradiado 24h después de la RA	115,7±5,1	73±2,4	61,8±4,6	6
Irradiado 48h después de la RA	118±4,6	64,7±3,5	57,5±3,8	6
Irradiado 72h después de la RA	112±6,1	70,4±6,5	59,8±4,8	5

n, número de ratones por grupo; ENT, sesión de entrenamiento; RA, sesión de reactivación; PR-LTM, sesión de evaluación de memoria ya formada.

4. RECLUTAMIENTO DE NEURONAS MADURAS E INMADURAS POR EL CIRCUITO HIPOCAMPAL EN EL PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS.

4.1. La neurogénesis hipocampal adulta modula la activación neuronal del hipocampo durante algunas fases de la formación/modificación de memorias de reconocimiento de objetos.

Los procesos de consolidación y reconsolidación requieren de síntesis de nuevas proteínas en cursos temporales definidos (McGaugh, 2000; Romero Granados y col., 2009), lo que permite el uso de proteínas que cambian su expresión tras actividad neuronal (por ejemplo los factores de transcripción c-Fos y Egr1) para trazar las áreas que se activan en cada momento tras la realización de un protocolo conductual (Guzowski y col., 2005).

Las proyecciones aferentes del GD confieren una segregación funcional en el eje septo-temporal hipocampal (Strange y col., 2014). En roedores, el hipocampo dorso-rostral se encuentra más relacionado con tareas de memoria espacial (reconocimiento de elementos y situaciones) mientras que el hipocampo ventro-caudal procesa el componente emocional (ansiedad). Por esta razón, realizamos un estudio de la distribución de c-Fos y Egr1 por inmunofluorescencia a lo largo del GD de ratones control (no irradiados) en las distintas fases del procesamiento de información de reconocimiento de objetos (**Fig.33**).

Aunque la expresión basal de c-Fos a lo largo del eje septo-temporal es baja (aunque mayor a nivel dorso-rostral que en ventro-caudal), tanto en la zona rostral como caudal se detecta una inducción significativa de la expresión de c-Fos en los GDs de ratones sacrificados 1,5h después de sesiones de entrenamiento o de reactivación (**Fig.33B**). En el caso de Egr1, la expresión basal fue similar a lo largo del eje septo-temporal del GD, mientras que la inducibilidad tras sesiones de entrenamiento y reactivación fue superior a nivel dorso-rostral que a nivel ventro-caudal del GD (**Fig.33C**). Estos datos globalmente indican que los cambios de expresión de c-Fos y Egr1 tras distintas sesiones de exploración son más claros en la región dorso-rostral que en la ventro-caudal del GD. Por ello, centraremos el análisis de la activación neuronal en los diferentes protocolos que inician los procesos de consolidación

y reconsolidación de reconocimiento de objetos sólo en la región dorso-rostral del hipocampo.

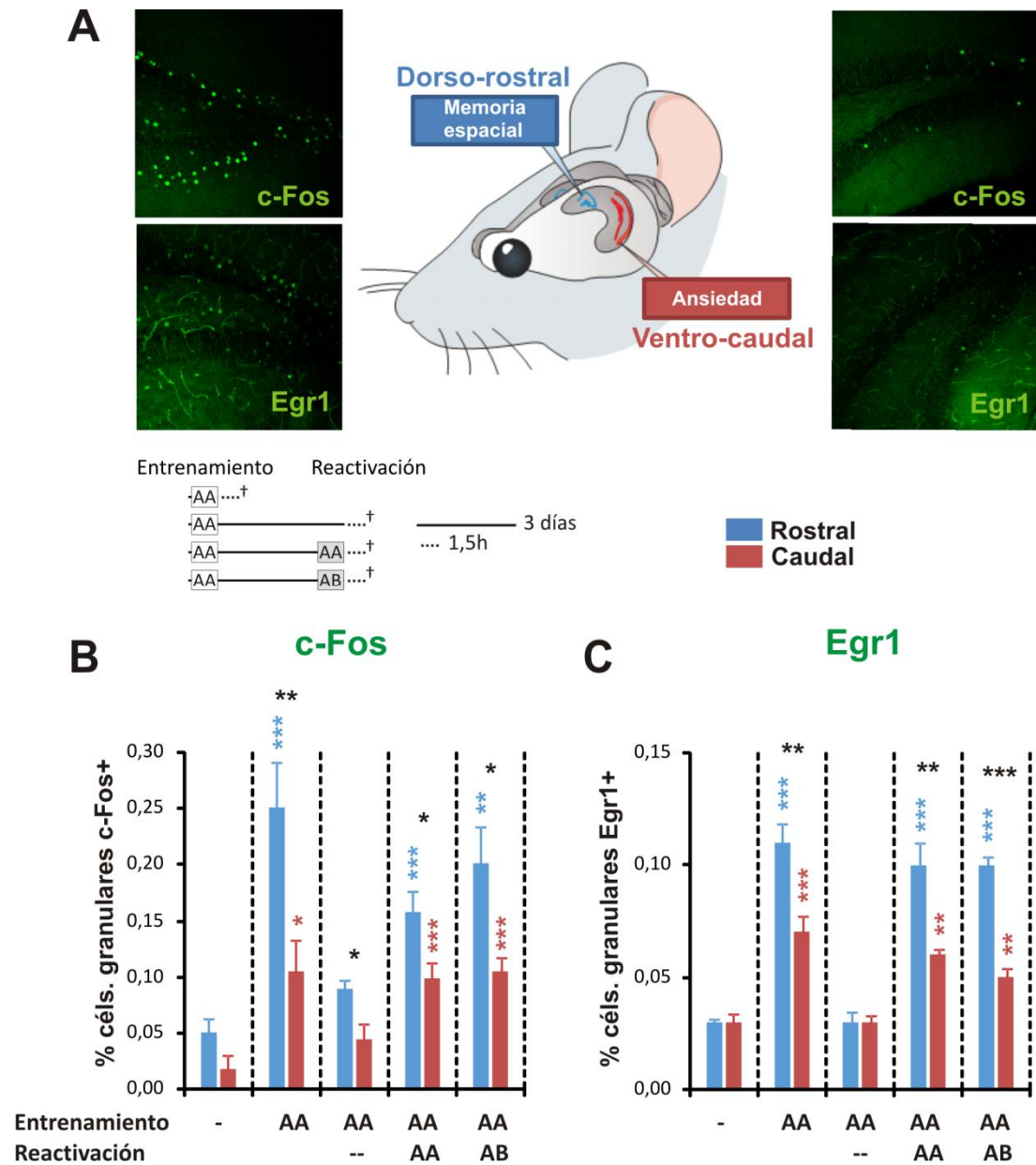


Figura 33. Distribución de la expresión de c-Fos y Egr1 a lo largo deleje septo-temporal del GD. A, Esquema e imágenes representativas de inmunofluorescencia para c-Fos y Egr1 (verde) en el eje septo-temporal del hipocampo, a nivel dorso-rostral (azul) y ventro-caudal (rojo). **B-C,** Cuantificación del porcentaje de neuronas granulares positivas para c-Fos (**B**) y Egr1 (**C**) del giro dentado dorso-rostral (azul) y ventro-caudal (rojo) en los diferentes grupos experimentales. Sobre los gráficos se muestra el esquema representativo del diseño experimental, donde la cruz representa el tiempo al cual son sacrificados los ratones de los diferentes grupos. N= 4 por grupo; varios cortes por animal. El * azul o rojo representa la significación respecto al grupo no entrenado y el * negro, la significación dentro del mismo nivel de GD: *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; y ***, $P<0.001$.

Por otro lado, y con el objetivo de minimizar el uso de animales, se compararon los cambios de expresión de c-Fos y Egr1 tras entrenamiento y

GD-CA3-CA1 estudiadas en respuesta a las sesiones de entrenamiento y reactivación. Es destacable que la reactivación con novedad provocó un incremento de la expresión de c-Fos significativamente superior que la reactivación sin novedad. El estudio de hipocampos de ratones irradiados reveló un menor grado de inducción de expresión de c-Fos por parte de las células granulares de GD (**Fig. 35C**) y las piramidales de CA3 y CA1 (**Fig.35D y E**, respectivamente) tras las sesiones de entrenamiento y reactivación con novedad, las cuales son dependientes de la neurogénesis hipocampal adulta.

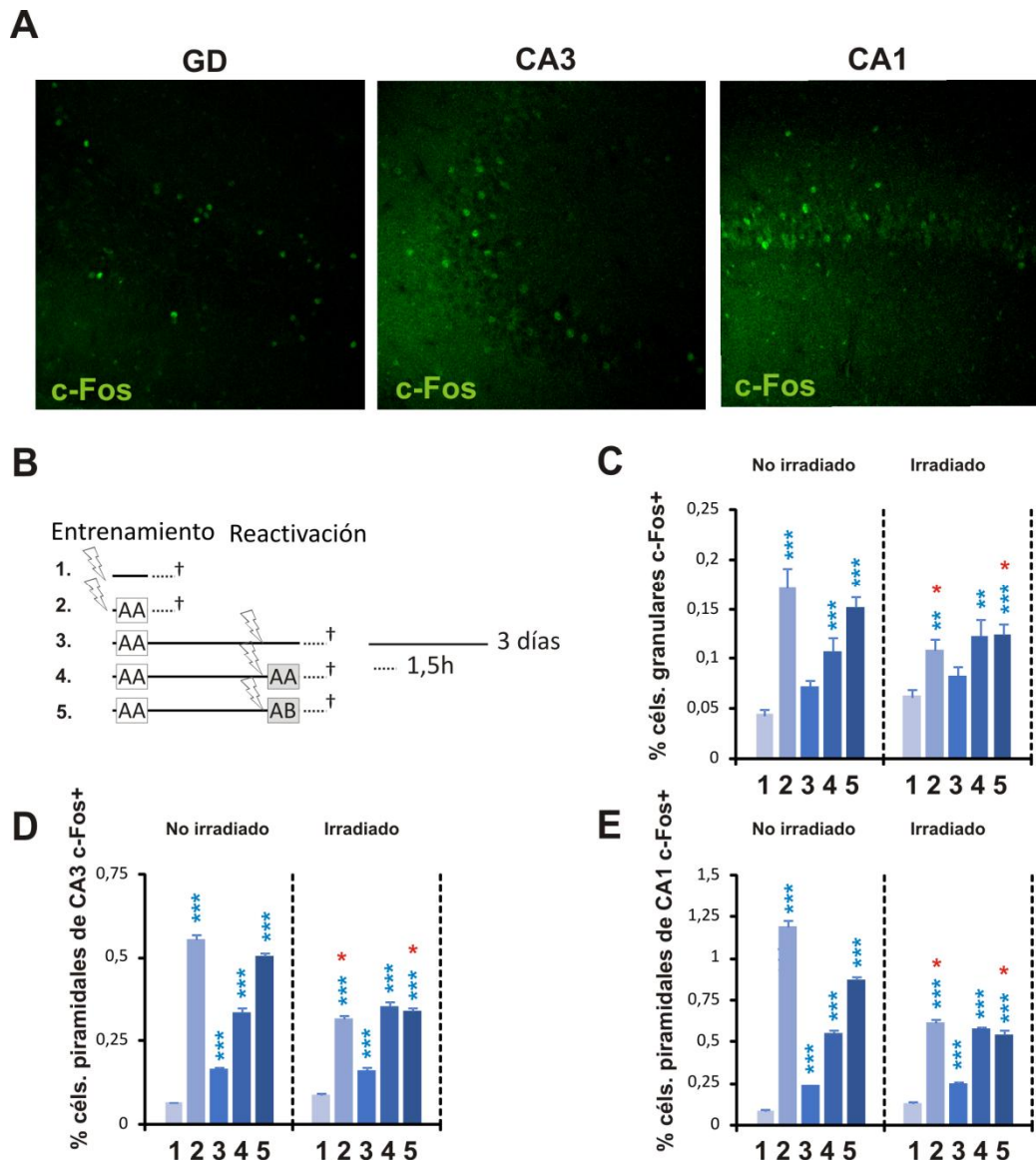


Figura 35. La inducción de c-Fos en el hipocampo tras entrenamiento y reactivación con novedad requiere de neurogénesis. **A**, Esquema de imágenes representativas de inmunofluorescencia para c-Fos (verde) del hipocampo; GD, CA3 y CA1. **B**, Esquema representativo del diseño experimental, donde la cruz representa el tiempo al cual son sacrificados los ratones de los diferentes grupos y el rayo, el tiempo al cual son irradiados. **C-E**, Cuantificación del porcentaje de neuronas granulares de GD (**C**) y células piramidales de CA3 (**D**) y CA1 (**E**) que expresan c-Fos en los hipocampos de los distintos grupos experimentales tras las diferentes sesiones exploración. N= 4 por grupo; varios cortes por animal. El * azul, representa la significación respecto al grupo no entrenado y el * rojo, con respecto al grupo no irradiado. *, P<0,05; **, P<0,01; y ***, P<0,001.

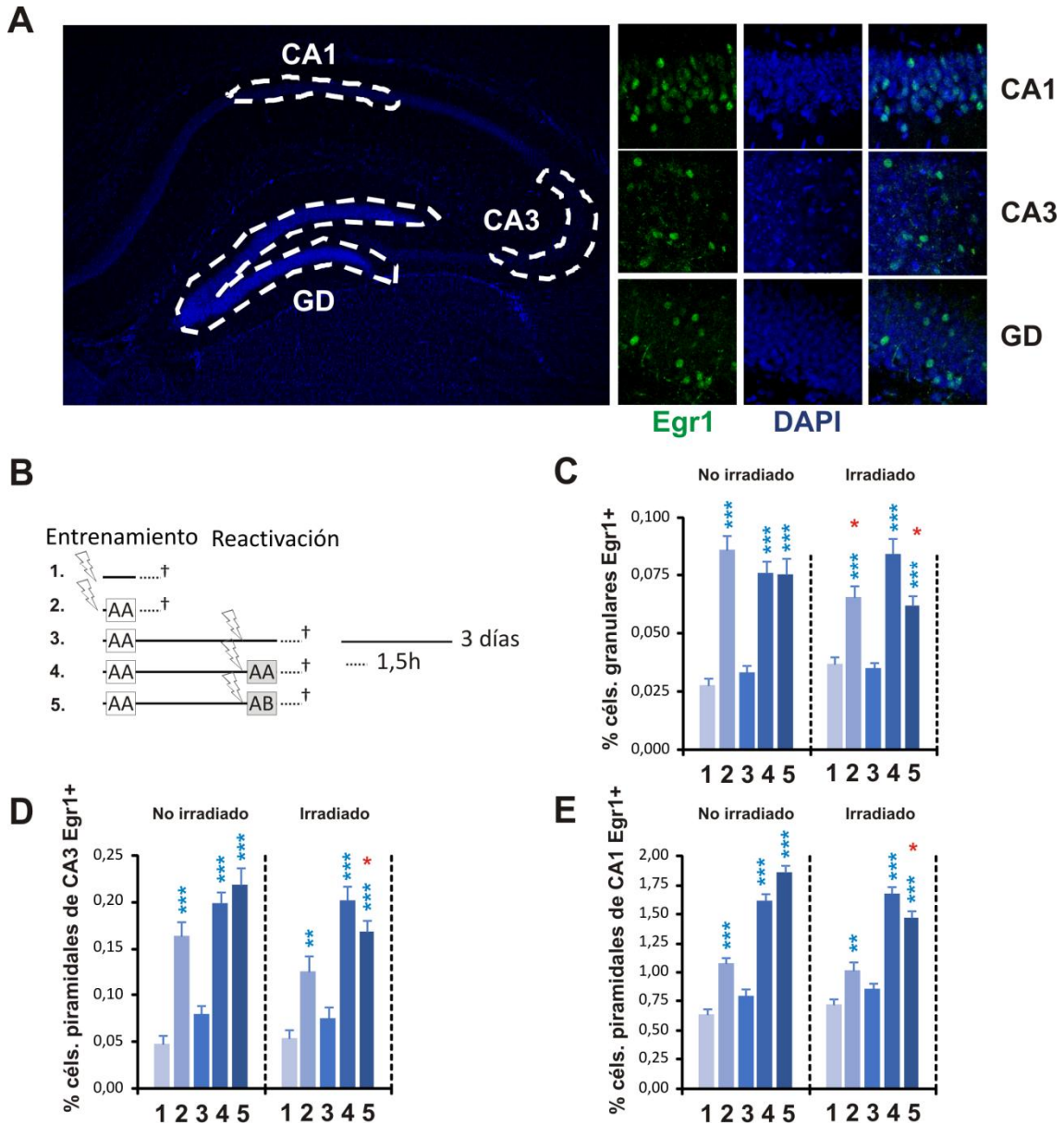


Figura 36. Las neuronas inmaduras afectan a la expresión de Egr1 de las neuronas de las distintas áreas del hipocampo. **A**, Esquema de imágenes representativas de inmunofluorescencia para Egr1 (verde) y DAPI (azul) del hipocampo; GD, CA3 y CA1. **B**, Esquema representativo del diseño experimental, donde la cruz representa el tiempo al cual son sacrificados los ratones de los diferentes grupos y el rayo, el tiempo al cual son irradiados. **C-E**, Cuantificación del porcentaje de neuronas granulares de GD (**C**) y células piramidales de CA3 (**D**) y CA1 (**E**) que expresan Egr1 en los hipocampus de los distintos grupos experimentales tras las diferentes sesiones exploración. N= 4 por grupo; varios cortes por animal. El * azul, representa la significación respecto al grupo no entrenado y el * rojo, con respecto al grupo no irradiado : *, P<0,05; **, P<0,01 y ***, P<0,001.

Por otro lado, los análisis de expresión de Egr1 (**Fig.36**) en los ratones no irradiados mostraron en GD, CA3 y CA1 un incremento de la expresión de Egr1 tras las sesiones de entrenamiento y reactivación (**Fig.36C, D y E**, respectivamente). Por su parte, las células piramidales de CA3 y CA1 del hipocampo muestran mayor inducibilidad tras una sesión de reactivación que tras una sesión de entrenamiento (**Fig.36C y D**, respectivamente). Estos

resultados ponen de manifiesto una segregación funcional en el procesamiento de la información de reconocimiento de objetos entre las regiones hipocampales. El mismo estudio en hipocampos de ratones irradiados reveló que en general la inducibilidad de Egr1 es similar a la de los grupos no irradiados excepto en GD tras la sesión de entrenamiento y en GD, CA3 y CA1 tras una reactivación con novedad donde las inducciones de Egr1 fueron inferiores que del grupo no irradiado (**Fig.36C-E**).

Por lo tanto, los resultados obtenidos para ambos marcadores de cambio de actividad neuronal apoyan los resultados conductuales obtenidos, así como que la neurogénesis hipocampal adulta participa en los mecanismos de memoria y que es necesaria para la correcta activación de los circuitos hipocampales en el procesamiento de información de reconocimiento de objetos durante la formación de nuevas memorias y para la actualización de memorias ya almacenadas.

4.2. Las neuronas inmaduras adultas son reclutadas por el circuito hipocampal durante el procesamiento de novedad en el reconocimiento de objetos.

Puesto que a nivel conductual, la formación de nuevas memorias y la actualización de memorias de reconocimiento de objetos dependen de la neurogénesis hipocampal adulta y que los niveles expresión de marcadores de cambio de actividad neuronal del hipocampo se ven modulados por este proceso, quisimos obtener una evidencia que pusiera de manifiesto la activación de las neuronas inmaduras adultas en la formación de nuevas memorias y actualización de memorias ya almacenadas de reconocimiento de objetos. Para ello, realizamos inmunofluorescencia para doblecortina (DCX), un marcador de neuronas inmaduras, y Egr1, trazador de actividad neuronal e integración neuronal en circuitos activos (Guzowski y col, 2005), en GDs de animales no entrenados, entrenados, no reactivados y reactivados, con o sin exposición a novedad (**Fig.37A y B**). Se observó un muy bajo porcentaje de neuronas inmaduras DCX+ expresando Egr1 en las condiciones de no exploración ($0 \pm 0,5\%$), no reactivación ($0,71 \pm 0,52\%$) o reactivación sin novedad ($0,13 \pm 0,13\%$), que se incrementó significativamente en los GDs de ratones sacrificados 1,5h después de la sesión de entrenamiento ($3,21 \pm 0,82\%$) o de reactivación con novedad ($3,43 \pm 0,56\%$) (**Fig.37C**). Estos resultados sugieren que las neuronas inmaduras hipocampales son reclutadas/activadas en los circuitos hipocampales tras la exposición a elementos novedosos ya sea para almacenar nueva información o bien para actualizar información ya almacenada. Además, dados los resultados obtenidos anteriormente en animales irradiados en el estudio de expresión de c-Fos y Egr1, implica que las

neuronas inmaduras modulan la actividad neuronal en el circuito DG-CA3-CA1 para el procesamiento de la información de reconocimiento de objetos.

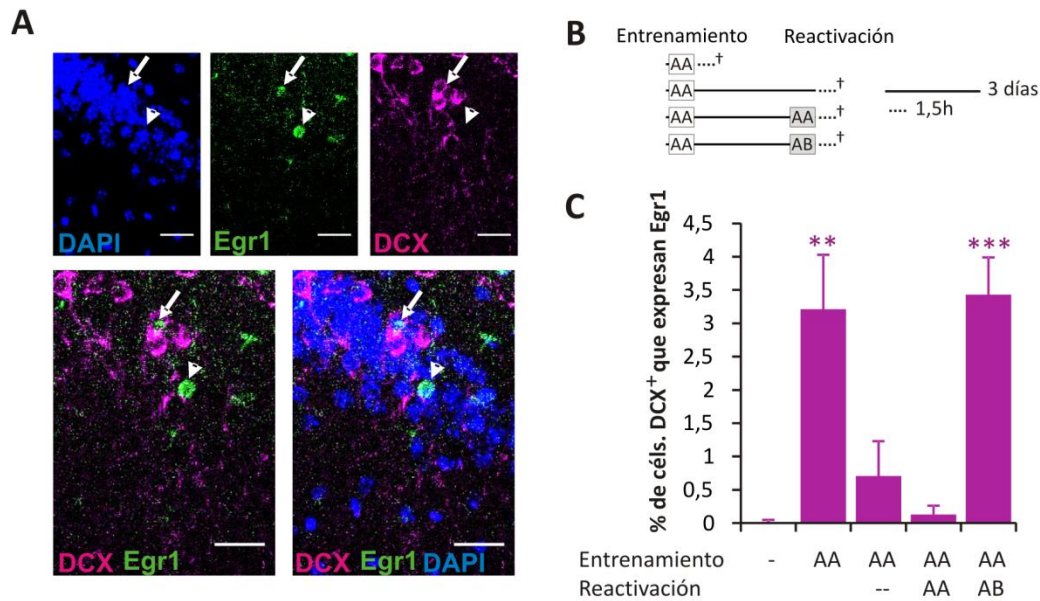


Figura 37. Las neuronas inmaduras adultas son reclutadas/activadas durante el procesamiento de novedad en el paradigma de reconocimiento de objetos. **A**, Imágenes representativas de inmunofluorescencia para Egr1 (verde), doblecortina (DCX, púrpura) y DAPI (azul). También se muestran las composiciones de DCX y Egr1, y DCX, Egr1 y DAPI, en las cuales se señala una célula DCX⁺ (flecha) y una célula granular (cabeza de flecha) que expresan Egr1. **B**, Esquema representativo del diseño experimental, donde la cruz representa el tiempo al cual son sacrificados los ratones de los diferentes grupos. **C**, Cuantificación del porcentaje de neuronas inmaduras DCX positivas que expresan Egr1 en los diferentes grupos experimentales. N= 4 por grupo; varios cortes por animal. *, representa la significación respecto al grupo no manipulado: **, P<0.01; y ***, P<0.001.

5. DISCUSIÓN

La existencia de génesis de nuevas neuronas en el sistema nervioso adulto es relativamente reciente (revisado por Gross, 2000). La producción diaria de miles de neuronas y su incorporación a los circuitos existentes, aproximadamente supone ~1% a lo largo de toda la vida del individuo, son fenómenos costosos en términos de consumo de energía. Además, el hecho de que sea un proceso mantenido por la evolución en las especies, incluido el humano (Ernst y col., 2015), despierta el interés científico hacia este pequeño porcentaje de células de reposición (**Fig. 38**).

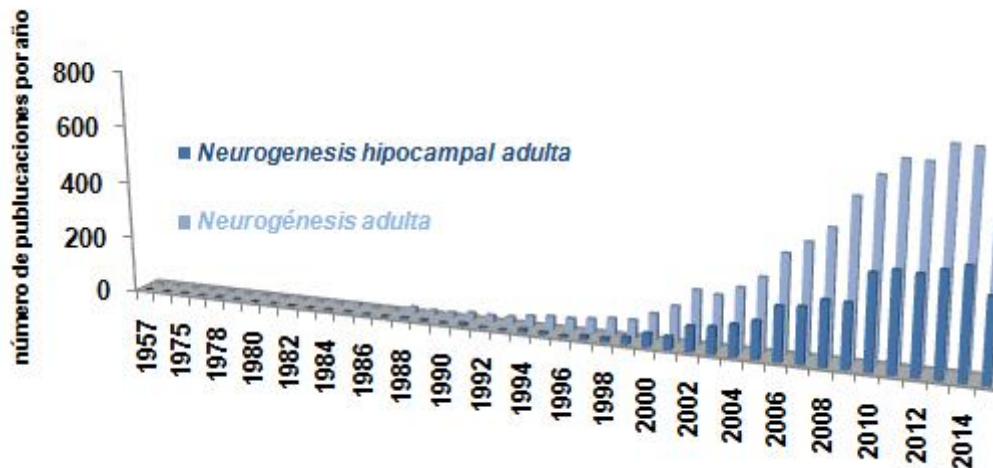


Figura 38. Evolución de la investigación sobre neurogénesis hipocampal adulta en relación a la neurogénesis adulta hasta la actualidad (número de publicaciones por año). Datos tomados de PubMed.gov.

5.1. Necesidad de un método para el abordaje del papel de la neurogénesis adulta en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo.

La existencia de neurogénesis hipocampal adulta ha suscitado numerosas hipótesis a cerca de la importancia de este proceso. Una explicación intuitiva sería que la generación continua de nuevas neuronas proporcione un mecanismo necesario para ciertas funciones del GD, uno de los nichos neurogénicos del cerebro adulto, que no se podrían realizar con la estructura que forman las neuronas maduras exclusivamente. Esta cuestión conduce a muchas otras, aunque tiene una especial relevancia el dilucidar cómo la neurogénesis hipocampal adulta contribuye al funcionamiento de los circuitos cerebrales (Snyder y Cameron, 2012). La respuesta a esta pregunta requiere del desarrollo de técnicas que permitan la ablación rápida, eficiente y selectiva de la neurogénesis adulta sin ocasionar efectos colaterales o compensatorios al método de inhibición.

En este sentido, el presente trabajo presenta un procedimiento de ablación rápida y eficiente de la neurogénesis adulta por irradiación con rayos X. La clave de este diseño radica en la elección de una dosis e intensidad de irradiación que elimine con alta eficiencia la población neurogénica, sin afectar a la integridad del sistema, ni provocar efectos no deseados al tratarse de una metodología masiva (Abdallah y col., 2007; Kitamura y col. 2009). Así, hemos desarrollado un protocolo de irradiación que implica la administración de una única dosis de radiación (10Gy) a baja intensidad (0,35Gy/min), lo cual elimina entorno al 85-90% de células neurogénicas en las 4-6h posteriores a la sesión de irradiación.

Los rayos X como radiación ionizante afecta a las células con capacidad de división, ello implica que la irradiación actúa sobre las regiones neurogénicas, afectando a los precursores neurales tanto neurogénicos como gliogénicos. Centrándonos en la SGZ del GD del hipocampo, la mayoría de las células en proliferación se diferencian a neuronas (neurogénesis) (Steiner y col., 2004), lo que implica que nuestro protocolo selectivamente reduzca tanto los precursores neuronales que expresan nestina como los neuroblastos/neuronas inmaduras que expresan doblecortina (DCX). En cuanto a los precursores, nuestros resultados muestran que la ablación de células neurogénicas es reversible, ya que detectamos tasas normales de proliferación (por expresión del marcador proliferativo pcna) en el GD tan solo 3 días después de la irradiación y la recuperación de células precursoras nestina+ 7días después de la irradiación. Es interesante resaltar que la recuperación de la neurogénesis es diferencial a lo largo del eje longitudinal del GD, lo cual concuerda con estudios existentes que describen una mayor tasa de neurogénesis en la región dorsal del hipocampo adulto (Snyder y col., 2009; Ferland y col., 2002)

Por otro lado, para el estudio de neuronas inmaduras se seleccionó el marcador doblecortina (DCX), una proteína asociada a microtúbulos que se expresa en neuroblastos y neuronas inmaduras, porque está ampliamente consensuado que su expresión refleja los niveles de neurogénesis en el GD adulto (Brown y cols., 2003; Rao y Shetty, 2004; Couillard-Despres y cols., 2005). Debido a que la expresión del marcador DCX se da en una ventana temporal muy amplia de la neurogénesis hipocampal adulta, desde progenitores de amplificación transitoria a células post-mitóticas tempranas (Kronenberg y col., 2003; Brown y col., 2003), el estudio de esta proteína nos permite visualizar una población considerable de neuronas inmaduras que son aptas para su reclutamiento e integración en circuitos hipocampales activos. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que nuestro protocolo de irradiación reduce entorno al 90% de células DCX+, puesto que estas células mantienen capacidad de división, aunque sea en una baja tasa. El porcentaje de células DCX+ que sobreviven a la irradiación podrían representar a las

células casi maduras que expresan DCX distinguibles del resto de la población por la coexpresión de calretinina, y posiblemente NeuN, marcadores de neuronas inmaduras post-mitóticas durante la neurogénesis hipocampal adulta (Brandt y Jessberger, 2003).

Un aspecto muy importante en la selectividad del método desarrollado en este trabajo, es que las neuronas maduras se mantengan intactas, estructural y electrofisiológicamente. Nuestros estudios morfométricos en el GD no revelan diferencias en el área de esta estructura desde pocas horas después de la irradiación hasta una semana después de esta. A nivel celular, la morfología de las células granulares maduras, las neuronas principales que constituyen el GD y que son inmunoreactivas para calbindina, no se ve afectada por la irradiación, ni en la morfología ni en la distribución del soma ni de sus terminaciones dendríticas y axónicas. Igualmente, tampoco se observa una alteración grosera en cuanto a otros componentes importantes en el circuito hipocampal, las interneuronas. Estos datos morfológicos se ven corroborados por el hecho de que el protocolo de rayos X no perturba la actividad electrofisiológica cerebral en su conjunto, ni de las células granulares maduras, ni incluso su conectividad con el resto del circuito hipocampal. Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por otros autores que utilizan protocolos de ablación de neurogénesis más agresivos (Lacefield y col., 2012), donde se observa un incremento en la amplitud de los trenes de frecuencia gamma espontáneos en el GD e *hilus* de ratón, un indicador de una potenciación de la sincronización de disparo de las células del GD a esta estimulación. Nuestro protocolo de ablación pone de manifiesto que otros métodos de inhibición permanentes de la neurogénesis adulta pueden provocar alteraciones compensatorias en las conexiones hipocampales, lo que puede ocasionar interpretaciones erróneas del papel de la neurogénesis en los procesos cognitivos.

Está ampliamente establecido en la literatura que la irradiación del cerebro con rayos X puede provocar neuroinflamación (Saeed y col., 2014; Son y col., 2015). Los procesos neuroinflamatorios afectan negativamente no solo a la neurogénesis (Fuster-Matanzo y col., 2013), sino también en la morfología neuronal (Fuster-Matanzo y col., 2013; Llorens-Martín y col., 2013). Estas alteraciones pueden manifestarse en alteraciones de aspectos cognitivos. Sin embargo, el protocolo de irradiación que se describe en este trabajo no produce incremento de la microglía reactiva en los GDs de los animales irradiados, ni en los niveles transcripcionales de las citoquinas asociados a los procesos de inflamación. Estos resultados ponen de manifiesto que el protocolo de ablación de neurogénesis usado en este trabajo no provoca respuesta inflamatoria.

Por último, además de la eficiencia, rapidez y selectividad del protocolo de irradiación para eliminar la neurogénesis, este protocolo permite el estudio

de la implicación de la neurogénesis hipocampal adulta en los procesos cognitivos, ya que al realizarse en el animal despierto e inmovilizado se pueden realizar pruebas conductuales poco tiempo después de la irradiación. El protocolo de irradiación requiere la inmovilización de los ratones durante un periodo de 30min, sin embargo la ansiedad y estrés asociados a este hecho parecen no afectar a las capacidades sensoriomotoras (capacidades sensoriales, motoras y actividad exploratoria) y cognitivas tanto en animales inmovilizados no irradiados como irradiados.

5.2. Las neuronas inmaduras adultas participan en los procesos de aprendizaje y memoria que dependen del hipocampo.

Dado que existe un nicho neurogénico en el hipocampo, muchos estudios han pretendido establecer el papel de la neurogénesis adulta en el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, existen muchas evidencias controvertidas al respecto (revisado por Marín-Burgin y Schinder, 2012). En los trabajos pioneros de Shors y col., la reducción de la neurogénesis hipocampal adulta tras el uso de un inhibidor de la división celular disminuyó el aprendizaje de la asociación temporal de dos estímulos separados en el tiempo (condicionamiento clásico del parpadeo), mientras que no se vieron alterados otros paradigmas que también dependen del hipocampo, como el aprendizaje espacial en el laberinto de Morris, el condicionamiento de miedo al contexto o el test del laberinto de 4brazos (Shors y col., 2001; Shors y col., 2002). Partiendo de este precedente, se ha demostrado la implicación de las nuevas neuronas en la adquisición flexible de relaciones espacio-temporales entre señales del entorno (Koehl y Abrous, 2011), proponiéndose que la neurogénesis hipocampal adulta ayuda a separar eficientemente unidades de información y participa activamente en la codificación temporal y en la memoria episódica (Kempermann y col., 2008). De hecho, la separación de patrones, la habilidad de distinguir información separada en el tiempo (hecho que ocurre frecuentemente durante aprendizaje emocional), es una de las funciones que más se ha asociado a la neurogénesis adulta (Kempermann, 2012; Snyder y Cameron, 2012). Sin embargo, resulta intrigante que trabajos posteriores hayan demostrado efectos específicos de las nuevas neuronas adultas en algunos de los paradigmas cognitivos que no se vieron afectados en los experimentos realizados por el grupo de Shors (revisado por Marín-Burgin y Schinder, 2012). Estos resultados aparentemente controvertidos parecen explicarse por las diferencias en la eficiencia de eliminación de nuevas neuronas, la edad de las células eliminadas a la hora de llevar a cabo la prueba de memoria, los propios paradigmas cognitivos utilizados o la activación de mecanismos compensatorios de los circuitos neuronales, producto de la inhibición a largo plazo de la neurogénesis que se describen en los distintos estudios.

La mayor parte de los estudios existentes se centran en estudiar el papel de las nuevas neuronas maduras generadas en el individuo adulto en los

procesos cognitivos (Saxe y col., 2006), cuando las neuronas inmaduras adultas del giro dentado podrían tener funciones específicas durante su maduración independientes y/o diferentes de las funciones que podrían tener ya maduras. Esto es debido a la escasa metodología adecuada para la manipulación del proceso de neurogénesis adulta a tiempos cortos. Así, gracias al desarrollo de nuestro protocolo de ablación rápida y específica, el principal objetivo de este trabajo ha consistido en estudiar la neurogénesis hipocampal adulta para determinar el papel específico de los distintos estadios neurogénicos del giro dentado en cada una de las fases del proceso del aprendizaje y la memoria. Nuestros resultados demuestran que la neurogénesis hipocampal adulta es necesaria para el aprendizaje y consolidación de dos paradigmas que dependen de hipocampo: reconocimiento de objetos (Myhrer, 1988 y 1989), y evitación pasiva (que también depende de amígdala) (Phillips y LeDoux, 1992; Maren y Holt, 2000). Nuestros resultados coinciden parcialmente con aquellos obtenidos por el grupo del Dr. Frankland utilizando procedimientos optogenéticos donde demuestran que la inactivación selectiva de las neuronas inmaduras de 4 semanas de edad provoca solamente deterioro de consolidación de memorias de miedo al contexto (Gu y col., 2012). Por otro lado, nuestros hallazgos son contrapuestos a aquellos obtenidos por el grupo del Dr. Henke observan mejora de la memoria de reconocimiento de objetos tras eliminar irreversiblemente la neurogénesis con un protocolo de irradiación con rayos X (Denny y col. 2012). Estas discrepancias podría explicarse por los distintos periodos de neuronas inmaduras seleccionados para inactivar/eliminar y al de mecanismos compensatorios desencadenados por la ablación duradera de la neurogénesis, respectivamente.

Muchos estudios sobre amnesia retrógrada han demostrado que la consolidación de la memoria se inicia en el hipocampo durante una fase de consolidación celular que requiere de cascadas de señalización celular y de síntesis de proteínas. Sin embargo, esta dependencia hipocampal se reduce progresivamente con el tiempo a la vez que aumenta gradualmente la dependencia de la corteza cerebral, proceso comúnmente conocido como consolidación sistémica (Álvarez y Squire, 1994; Dudai, 2004; Frankland y Bontempi, 2005; Wang y Morris, 2010; Álvarez-Salvado y col., 2013). A partir de estudios en los que se modula los niveles de neurogénesis adulta, más allá de facilitar o inhibir este proceso, se ha sugerido una relación causal entre la neurogénesis adulta y el periodo de dependencia hipocampal de la memoria asociativa al miedo (Kitamura y col., 2009). Además, se ha demostrado que la delección de *erk5*, una proteína requerida para la maduración de las nuevas neuronas, afecta a la expresión de la memoria remota (Pan y col., 2012a y b). Estas evidencias indican que las neuronas inmaduras podrían participar en ambos procesos de consolidación de memorias, celular y sistémica.

En este trabajo además hemos estudiado el periodo en el que las neuronas inmaduras son requeridas para la formación de una memoria duradera que depende del hipocampo con distintos requerimientos emocionales: sin o con bajo componente emocional (reconocimiento de objetos, RO) y con un alto componente emocional (evitación pasiva, EP). Nuestros resultados indican que estos tipos de memoria tienen un requerimiento temporal del proceso de neurogénesis adulta diferente: en EP las neuronas inmaduras son requeridas durante al menos 7 días tras la sesión de entrenamiento, mientras que sólo 3 días son necesarios en el caso de RO. Lo cual sugiere que estos tiempos son los necesarios para que una neurona inmadura sensible a irradiación pase a madura no sensible a irradiación. Estos resultados pueden ser un reflejo de la diferente tasa de neurogénesis y al diferencial papel funcional del hipocampo a lo largo del eje septo-temporal. En cuanto a la tasa de maduración a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo (Piatti y col., 2011), el proceso neurogénico es más rápido en el polo septal que en el temporal del GD. El tiempo que una nueva neurona pasa en el estadio inmaduro podría tener un impacto fuerte en el procesamiento cognitivo del hipocampo y en la resolución temporal de nuevas memorias. Así, una maduración neuronal más lenta como la que se observa en el giro dentado ventral puede representar un marco temporal más prolongado dentro del cual asociar diferentes sucesos. Por otro lado, el hipocampo presenta una conectividad diferencial en el eje septo-temporal (revisado por Sahay y Hen, 2007), lo cual conlleva una segregación funcional de aspectos visuoespaciales y emocionales en el polo septal y temporal, respectivamente (revisado por Moser y Moser, 1998). De hecho, la activación y/o inactivación selectiva de estas subregiones rostral y caudal (Kheirbek y col., 2013) o la ablación selectiva del proceso de neurogénesis a lo largo del giro dentado (Wu y col., 2014), corrobora el predominio dorsal en relación a la actividad exploratoria y la ventral, en relación a la ansiedad. En conjunto con otros estudios (revisado por Fanselow y col., 2010), nuestros datos indican que tanto el hipocampo como el giro dentado están funcionalmente segmentados, de modo que las funciones cognitivas son procesadas fundamentalmente en el área dorso-rostral y las emocionales/afectivas, por la ventro-caudal.

5.3. La neurogénesis hipocampal adulta interfiere en los procesos de plasticidad sináptica duradera.

La integración funcional de las nuevas neuronas en el circuito aferente del giro dentado se demostró por primera vez en el año 2002 (van Praag y col., 2002). Estudios posteriores fortalecieron este hallazgo al descubrirse inducción de la expresión de genes tempranos como consecuencia del aprendizaje espacial o la inducción de convulsiones en neuronas BrdU positivas, que incorporaron este nucleótido en su ADN 25 días antes de las manipulaciones conductuales (Jessberger y Kempermann, 2003). Pero, son estudios recientes

los que han evidenciado la integración en circuitos de las nuevas neuronas granulares adultas a nivel morfológico y fisiológico (Toni y col., 2008).

Diversos estudios de plasticidad en el giro dentado *in vitro* han revelado propiedades heterogéneas entre la zona externa e interna de la capa de células granulares. Mientras que las neuronas de la zona externa solo presentan LTP cuando se bloquea la inhibición GABAérgica, las neuronas de la zona interna muestran inducción de LTP aún en presencia de inhibición (Wang y col., 2000). De hecho, estas células que presentan una mayor plasticidad corresponden a nuevas neuronas inmaduras adultas. Posteriormente, se demostró la existencia de un tipo particular de LTP (LTP mediada por receptores NR2B) que desaparece ante la ablación del proceso de neurogénesis (Snyder y col., 2001, Saxe y col., 2006, Kheirbek y col., 2012), por lo tanto, es una característica de las neuronas inmaduras poseer un umbral más bajo para la inducción de LTP en presencia de inhibición GABAérgica (Schmidt-Hieber y col., 2004). Además, también ha sido descrito un periodo de maduración de las nuevas neuronas granulares (4-6 semanas) en el que la expresión de LTP se encuentra aumentada (Ge y col., 2007), así como que las neuronas inmaduras son mucho más excitables (Mongiat y col., 2009). Todos estos hallazgos avalan que las neuronas inmaduras se integran al circuito hipocampal y que poseen mecanismos de plasticidad únicos durante un período acotado de su maduración.

Teniendo en cuenta que la potenciación a largo plazo es el principal candidato para explicar los mecanismos subyacentes del aprendizaje y la memoria, la correlación entre aprendizaje y neurogénesis sugiere una estrecha relación entre la LTP y la neurogénesis. Nuestros resultados muestran que la ablación de la neurogénesis interfiere en las pruebas de comportamiento, así como impide la inducción de LTP en el GD *in vivo* en el ratón anestesiado. En apoyo, existen estudios en los que el ejercicio físico no sólo mejora la neurogénesis y la memoria espacial, sino también la inducción de LTP en el GD de ratones (van Praag y col., 1999) y ratas (Farmer y col., 2004). En su conjunto, estos hechos han asentado la reciente hipótesis que dada la alta excitabilidad de las neuronas inmaduras adultas, éstas serían capaces de responder más inespecíficamente a diferentes patrones de información (Aimone y col., 2006). Por tanto, las neuronas inmaduras adultas serían más asociativas durante un período específico de su maduración, lo que estaría de acuerdo con el papel de las neuronas inmaduras adultas en el condicionamiento clásico de memoria en traza (Shors y col., 2001), en la versión asociativa del laberinto de Morris complejo (Dupret y col., 2008) y en memorias de reconocimiento de objetos y evitación pasiva como se muestra en el presente trabajo.

5.4. La neurogénesis hipocampal adulta es necesaria en el proceso de modificación de memorias ya almacenadas.

La formación de memoria duradera no está solo asociada a la estabilización de la información adquirida (consolidación), sino también a la capacidad de modificar memorias ya almacenadas por experiencias relacionadas (reconsolidación). Aunque los primeros estudios revelaron que eran procesos similares (Dudai, 2004; Alberini y col., 2005; Tronson y Taylor, 2007), posteriormente se ha descubierto que los mecanismos celulares y moleculares asociados a ambos procesos son diferentes, tanto en expresión génica, como incluso en las áreas cerebrales involucradas (Debiec y LeDoux, 2004; Romero-Granados y col., 2009, Barnes y col., 2012; Lee y col., 2013). Sin embargo, si la neurogenesis interviene en el proceso de reconsolidación es un campo aún desconocido.

La función de la reconsolidación es estabilizar y reforzar una memoria ya almacenada (Przybylski y Sara, 1997; Lee, 2008) y/o incorporar nueva información (actualizar) en la traza de memoria ya existente (Lee, 2009-2010), dependiendo de cómo se lleve a cabo la sesión de reactivación (con o sin novedad). En el presente trabajo, empleando el paradigma de reconocimiento de objetos, se demuestra que la neurogénesis hipocampal adulta sólo se requiere cuando la sesión de reactivación implica novedad y se lleva a cabo la actualización de recuerdos. Curiosamente el requerimiento temporal de la neurogénesis adulta por parte del proceso de reconsolidación es el mismo que para el proceso de consolidación. Estos requisitos temporales sugieren que las neuronas inmaduras activadas en la formación o reactivación con novedad maduran en este periodo, de modo que se vuelven insensibles a la irradiación y no se ve afectada la memoria. Esto se ve apoyado por estudios que demuestran que la supervivencia e integración neuronal dependen de la experiencia transcurrida y de la activación del receptor NMDA en un período de su maduración (Tashiro y col, 2006; Tashiro y col., 2007). Por otra parte, las nuevas neuronas maduras adultas se activan preferentemente con las experiencias relacionadas a las que ocurrieron durante su maduración (Tashiro y col, 2007; Kee y col., 2007). Estos datos indican que los circuitos activos durante la maduración neuronal adulta podrían seleccionar la conectividad de las neuronas inmaduras nuevas y a la vez ser modulados por la integración específica de nuevas unidades funcionales.

Se postula que gracias al papel de la neurogénesis en el proceso de reconsolidación, la red hipocampal puede adaptarse a niveles de novedad y complejidad a lo largo de la vida, e integrar información relevante y nueva en una representación aprendida (Garthe y col., 2009). Por lo tanto, parece que la neurogénesis adulta en el hipocampo podría contribuir a la adecuación del individuo a entornos cambiantes (Kempermann, 2012). Además, globalmente, el conocimiento del papel de la neurogénesis adulta en la función hipocampal

podría proporcionar nuevas vías terapéuticas para enfermedades asociadas a trastornos cognitivos asociados a experiencias traumáticas.

Los precursores neuronales generados a partir de la división de progenitores en el giro dentado adulto evolucionan a través de varias etapas para convertirse en células granulares maduras indistinguibles de las células granulares formadas durante el desarrollo embrionario (Kempermann, 2004; Laplagne, 2006). Está descrito que estas nuevas neuronas adultas se activan en la formación y/o la expresión de la memoria, lo que indica que se integran en las redes funcionales del hipocampo (von hertzenrg y col., 2005).

5.5. Las neuronas inmaduras son reclutadas por los circuitos activos del procesamiento de información y modulan la actividad neuronal.

En nuestro trabajo hemos realizado un estudio detallado de la activación de neuronas tanto en la región dorso-rostral como ventro-caudal del giro dentado, tras exposición a sesiones de exploración que desencadenan cada una de las fases del procesamiento de información de reconocimiento de objetos. Como se ha comentado anteriormente, la región dorsal hipocampal está implicada en procesos de aprendizaje y memoria, mientras que la región ventral está más relacionada con procesos emocionales y de ansiedad (Snyder y col., 2009). Esta idea se refuerza con el descubrimiento de los patrones de expresión génica diferencial que se dan en ambos polos del hipocampo (Dong y col., 2009; Fanselow y col., 2010).

En nuestro trabajo hemos utilizado la expresión de c-Fos y Egr1 como trazadores de activación de circuitos neuronales en el hipocampo. Nuestros resultados de inducibilidad indican que ambos marcadores aumentan su expresión tras sesiones de entrenamiento y reactivación de reconocimiento de objetos tanto en el polo septal como temporal del hipocampo, lo que contrasta con la rígida separación de funciones asignada a ambas regiones del hipocampo. Bien es verdad que si los patrones de inducibilidad son similares en ambos polos, el nivel de los cambios de expresión son superiores en el polo dorso-rostral que en el ventro-caudal, lo que concuerda con el papel predominante de esta región en el procesamiento de información sensorial. Además, la falta de neuronas inmaduras en nuestro modelo moduló el grado de inducibilidad en las áreas hipocampales implicadas (DG-CA3-CA1), fundamentalmente después de sesiones de entrenamiento y reactivación con novedad, lo cual resulta en concordancia con los déficits de conducta y de cambios de eficiencia sináptica hallados.

Egr1 y c-Fos son factores de transcripción que cambian su expresión dependiendo de la actividad neuronal (Wisden y col., 1990; Sheng y Greerberg, 1990; Curran y Morgan, 1995), por ello la expresión de ambas proteínas se utilizan para trazar circuitos neuronales activos en el cerebro (Xie y col., 2014;

Okuno, 2011). Nosotros, para conocer si las neuronas inmaduras se reclutan/activan durante los procesos de consolidación y reconsolidación de memorias de reconocimiento de objetos hemos realizado dobles marcajes de estos factores de transcripción con el marcador de neuronas inmaduras doblecortina (DCX). Nuestros estudios revelan una ausencia de expresión en neuronas inmaduras positivas para DCX en condiciones basales. Sorprendentemente, las sesiones de entrenamiento y reactivación de memorias de reconocimiento de objetos produjo un aumento diferencial del factor de transcripción Egr1 en las células DCX positivas: aunque nunca se detectó expresión de c-Fos, aproximadamente entre el 2-3% de las neuronas inmaduras expresaron Egr1 tras sesiones de exploración que presentaban novedad al individuo (es decir entrenamiento y reactivación con novedad). Estos resultados sugieren que las neuronas inmaduras solo se activan, expresan Egr1, cuando se va a almacenar nueva información, ya sea en forma de una nueva memoria o bien para actualizar una memoria ya adquirida. Además, este resultado refuerza la idea anticipada por trabajos del grupo del Dr. Laroche que sugieren que la activación de Egr1 en neuronas inmaduras adultas podría estar relacionada con la selección y maduración de estas células tras su activación (Veyrac y col., 2013), en este caso por la novedad.

En resumen, nuestros resultados sugieren que las neuronas inmaduras podrían estar relacionadas con la codificación de nueva información, mientras que las células granulares maduras codifican antiguos recuerdos (Aimone y col., 2011; Rangel y col., 2014).

6. CONCLUSIONES

- 1.** Una sesión única de irradiación local con rayos X (administrando 10Gy a baja intensidad en el ratón despierto e inmovilizado) conduce a una rápida, selectiva y eficiente ablación de la neurogénesis hipocampal adulta, sin causar efectos secundarios, y permitiendo la realización de comportamiento entre 4-6h después de la irradiación.
- 2.** Las neuronas inmaduras adultas son necesarias para la adquisición y consolidación de memorias que dependen del hipocampo: reconocimiento de objetos y evitación pasiva.
- 3.** La formación de memorias duraderas de reconocimiento de objetos y evitación pasiva poseen diferentes requerimientos temporales de neurogénesis hipocampal adulta (3 y 7 días, respectivamente).
- 4.** La falta de neurogénesis hipocampal adulta impide la inducción de potenciación sináptica duradera (LTP) en el giro dentado, correlato celular de los procesos de aprendizaje y memoria.
- 5.** La neurogénesis hipocampal adulta participa en los procesos de reconsolidación sólo cuando conducen a la actualización de memorias de reconocimiento de objetos ya almacenadas.
- 6.** El proceso de reconsolidación que conduce al refuerzo de una memoria de reconocimiento de objetos ya almacenada es independiente de neurogénesis hipocampal adulta.
- 7.** El proceso de reconsolidación que conduce a la actualización de memorias de reconocimiento de objetos ya almacenadas posee la misma demanda temporal de neurogénesis hipocampal adulta que el proceso de consolidación.
- 8.** La neurogénesis hipocampal adulta determina/afecta a la activación de las neuronas hipocampales maduras durante la formación de nuevas memorias y la actualización de memorias de reconocimiento de objetos.
- 9.** Las neuronas inmaduras adultas del hipocampo son reclutadas/activadas por los circuitos hipocampales en la adquisición de nueva información y la actualización de memorias de reconocimiento de objetos, es decir, por situaciones que contengan novedad.

BIBLIOGRAFÍA

Abdallah N.M.B, Slomianka, L. y Lipp, H.P. (2007). Reversible effect of X-irradiation on proliferation, neurogenesis, and cell death in the dentate gyrus of adult mice. *Hippocampus*, 17(12):1230-40.

Aberg, M.A., Aberg, N.D., Palmer, T.D., Alborn, A.M., Carlsson-Skewir, C., Bang, P., Rosengren, L.E., Olsson, T., Gage, F.H. y Eriksson, P.S. (2003). IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(1):23-40.

Abrous, D.N., Adriani, W., Montaron, M.F., Aurousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M. y Piazza, P.V. (2002). Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *Journal of Neuroscience*, 22:3656-3662.

Agasse, F., Roger, M. y Coronas, V. (2004). Neurogenic and intact or apoptotic nonneurogenic areas of adult brain release diffusible molecules that differentially modulate the development of subventricular zone cell cultures. *European Journal of Neuroscience*, 19:1459-68.

Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W. y Gage, F.H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological Reviews*, 94(4):991-1026.

Aimone, J.B., Wiles, J. y Gage, F.H. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature Neuroscience*, 9(6): 723-727.

Altman, J. (1962a). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135(3509): 1127-1128.

Altman, J. (1962b). Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Experimental Neurology*, 5: 302-318.

Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anatomical Record*, 145: 573-591.

Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis.IV.Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 137(4): 433-457.

Altman, J. y Das, G.D. (1965a). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124(3): 319-335.

Altman, J. y Das, G.D. (1965b). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207(5000): 953-956.

Álvarez, P. y Squire, L.R. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91:7041-7045.

Álvarez-Buylla, A. y Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41:683-686.

Álvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M. y Tramontin, A. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 2:287-293.

Amaral, D.G. y Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31:571-591.

Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. y Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Medicine*, 8(9):963-970.

Auvergne, R., Leré, C., El Bahh, B., Arthaud, S., Lespinet, V., Rougier, A. y Le Gal La Salle, G. (2002). Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. *Brain Research*, 954(2): 277-285.

Bai, F., Bergeron, M. y Nelson, D.L. (2003). Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 44:1013-21.

Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H. y Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus -- memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28: 273-283.

Bannerman, D.M., Sprengel, R., Sanderson, D.J., McHugh, S.B., Rawlins, J.N., Monyer, H. y Seeburg, P.H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(3):181-92.

Barkho, B.Z., Song, H., Aimone, J.B., Smrt, R.D., Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F.H. y Zhao, X. (2006). Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells and Development*, 15:407-421.

Barnea, A. y Nottebohm, F. (1996). Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93:714-718.

- Bast, T. y Feldon, J. (2003). Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Progress in Neurobiology*, 70:319-345.
- Bengzon, J., Kokaia, Z., Elmér, E., Nanobashvili, A., Kokaia, M. y Lindvall, O. (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(19): 10432-10437.
- Bernier, P.J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M. y Parent, A. (2002). Newly generated neurons in the amígdala and adjoining cortex of adult primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 11464–11469.
- Bingman, V.P. (1992). The importance of comparative studies and ecological validity for understanding hippocampal structure and cognitive function. *Hippocampus*, 2: 213- 219.
- Brezun, J.M. y Daszuta, A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogénesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*, 89: 999-1002.
- Brown, J.P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L. y Kuhn, H.G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *Journal of comparative neurology*, 467: 1-10.
- Burek, M.J. y Oppenheim, R.W. (1996). Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathology*, 6(4):427-46.
- Cameron, H.A. y Dayer, A.G. (2008). New interneurons in the adult neocortex: small, sparse, but significant? *Biological Psychiatry*, 63: 650 – 655.
- Cameron, H.A. y Gould, E. (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*, 61(2): 203-209.
- Cameron, H.A. y McKay, R.D. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature Neuroscience*, 2(10): 894-897.
- Cameron, H.A. y McKay, R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 435:406-417.
- Cameron, H.A., McEwen, B.S. y Gould, E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 15(6):4687-4692.
- Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S. y Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2): 337-344.

Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D.S., Liu, Y., Fong, D.M., Young, D. y During, M.J. (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature Genetics*, 36:827-835.

Carpentier, P.A. y Palmer, T.D. (2009). Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron*, 64(1): 79-92.

Chancey, J.H., Adlaf, E.W., Sapp, M.C., Pugh, P.C., Wadiche, J.I. y Overstreet-Wadiche, L.S. (2013). GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. *Journal of Neuroscience*, 33(15):6614-22.

Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Cuppini, R., Ambrogini, P., Santi, S., Benedetti, S., Del Grande, P. y Papa, S. (2002). Neural precursor proliferation and newborn cell survival in the adult rat dentate gyrus are affected by vitamin E deficiency. *Neuroscience Research*, 44(4):369-77.

Covolán, L., Ribeiro, L.T., Longo, B.M. y Mello, L.E. (2000). Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus*, 10(2): 169- 180.

Dayer, A.G., Cleaver, K.M., Abouantoun, T. y Cameron, H.A. (2005). New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *Journal of Cell Biology*, 168: 415–427.

Dayer, A.G., Ford, A.A., Cleaver, K.M., Yassaee, M. y Cameron, H.A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 460:563-572.

Demarque, M., Represa, A., Becq, H., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. y Aniksztejn, L. (2002). Paracrine intercellular communication by a Ca²⁺- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron*, 36: 1051–1061.

Deng, W., Aimone, J.B. y Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Review Neuroscience*, 11(5): 339-350.

Duman, R.S. (2004). Depression: a case of neuronal life and death? *Biological Psychiatry*, 56: 140-145.

Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M. y Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron*, 23:209-226.

Eisch, A.J., Barrot, M., Schad, C.A., Self, D.W., Nestler, E.J. (2000). Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97(13): 7579-7584.

Encinas, J.M., Michurina, T.V., Peunova, N., Park, J.H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A. y Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 8(5):566-79.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A. y Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11): 1313-1317.

Ernst, A. y Frisén, J. (2015). Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals. *PLoS Biology*, 13(1):e1002045.

Espósito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J. y Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *Journal of Neuroscience*, 25(44): 10074-10086.

Faigle, R. y Song, H. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830: 2435-2448.

Feliciano, D.M. y Bordey, A. (2013). Newborn cortical neurons: only for neonates? *Trends in Neurosciences*. 36, 51–61.

Felsenstein, K.M., Candelario, K.M., Steindler, D.A. y Borchelt, D.R. (2014). Regenerative medicine in Alzheimer's disease. *Translational Research*, 163(4):432-8.

Feng, R., Rampon, C., Tang, Y.P., Shrom, D., Jin, J., Kyin, M., Sopher, B., Miller, M.W., Ware, C.B., Martin, G.M., Kim, S.H., Langdon, R.B., Sisodia, S.S. y Tsien, J.Z. (2001). Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron*, 32(5): 911 - 926.

Ferland, R. J., Gross, R.A. y Applegate, C.D. (2002). Increased mitotic activity in the dentate gyrus of the hippocampus of adult C57BL/6J mice exposed to the flurothyl kindling model of epileptogenesis. *Neuroscience*, 115(3): 669-683.

Ferland, R.J., Gross, R.A. y Applegate, C.D. (2002). Differences in hippocampal mitotic activity within the dorsal and ventral hippocampus following flurothyl seizures in mice. *Neuroscience Letter*, 332:131-135.

Ferri, P., Cecchini, T., Ciaroni, S., Ambrogini, P., Cuppini, R., Santi, S., Benedetti, S., Pagliarini, S., Del Grande, P. y Papa, S. (2003). Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus. *Journal of Neurocytology*, 32(9):1155-64.

Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L.P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H. y Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23(3):373-82.

Forster, E., Zhao, S. y Frotscher, M. (2006). Laminating the hippocampus. *Nature Reviews Neuroscience*, 7:259-267.

Gage, F.H. y Temple, S. (2013). Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron*, 80:588–601.

Gage, F.H., Ray, J. y Fisher, L.J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annual Review of Neuroscience*, 18:159-92.

Garthe, A., Behr, J. y Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*, 4(5):e5464.

Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L. y Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439: 589 –593.

Ge, S., Yang, C.H., Hsu, K.S., Ming, G.L. y Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54: 559-566.

Glykys, J. y Mody, I. (2006). Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABA A receptor alpha5 subunit-deficient mice. *Journal of Neurophysiology*, 95:2796 –2807.

Goldman, S.A. y Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 80(8): 2390-2394.

Gould, E. (1999). Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, 21:S46-51.

Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. y Shors, T.J. (1999b). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2:260-265.

Gould, E., Cameron, H.A. y McEwen, B.S. (1994). Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 340(4):551-565.

- Gould, E., Cameron, H.A., Daniels, D.C., Woolley, C.S. y McEwen, B.S. (1992). Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 12(9): 3642-3650.
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A. y Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *Journal of Neuroscience*, 17(7): 2492-2498.
- Gould, E., Reeves, A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C.G. y Fuchs, E. (1999a). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96(9): 5263-5267.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, G. y Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 3168-71.
- Graztner, H.G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 413:146-154.
- Gross, C.G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: Death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, 1:67-73.
- Gross, C.G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Review Neuroscience*, 1(1):67-73.
- Halbach, O.v.B.u. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Research*, 329:409-420.
- Hastings, N.B. y Gould, E. (1999). Rapid extensión of axons into CA3 region by adult-generated granule cells. *Journal of Comparative Neurology*, 415(1):144.
- Hayes, N.L. y Nowakowski, R.S. (2002). Dynamics of cell proliferation in the adult dentate gyrus of two inbred strains of mice. *Developmental Brain Research*, 134(1-2):77-85.
- Heckers, S., Zalesak, M., Weiss, A.P., Ditman, T. y Titone, D. (2004). Hippocampal activation during transitive inference in humans. *Hippocampus*, 14:153-162.
- Herrera, D.G., Yagüe, A.G., Johnsen-Soriano, S., Bosch-Morell, F., Collado-Morente, L., Muriach, M., Romero, F.J. y García-Verdugo, J.M. (2003). Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100:7919-7924.

- Höglinger, G.U., Rizk, P., Muriel, M.P., Duyckaerts, C., Oertel, W.H., Caille, I. y Hirsch, E.C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, 7(7): 726-735.
- Holmes, M.M., Galea, L.A., Mistlberger, R.E. y Kempermann, G. (2004). Adult hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: circadian and dose-dependent effects. *Journal of Neuroscience Research*, 76(2):216-22.
- Hsieh, J. (2012). Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes & Development*, 26:1010-1021.
- Hüttmann, K., Sadgrove, M., Wallraff, A., Hinterkeuser, S., Kirchhoff, F., Steinhäuser, C. y Gray, W.P. (2003). Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *European Journal of Neuroscience*, 18(10):2769-78.
- Ihrle, R.A. y Álvarez-Buylla, A. (2011). Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*, 70:674–686.
- Kaplan, M.S. y Bell, D.H. (1983). Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Experimental Brain Research*, 52:1-5.
- Kaplan, M.S. y Hinds, J.W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308): 1092-1094.
- Kawakita, E., Hashimoto, M. y Shido, O. (2006). Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience*, 139(3):991-7.
- Kempermann, G. (2011a). Adult Neurogenesis 2. Stem cells and neuronal development in the adult brain. Oxford University Press.
- Kempermann, G. (2011b). Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 33:1018-1024.
- Kempermann, G. (2012). Youth culture in the adult brain. *Science*, 335:1175-1176.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M. y Gage, F.H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2):391-9.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. y Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences*, 27(8):447-52.

Kempermann, G., Kuhn, H.G. y Gage, F.H. (1997a). Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(19):10409-14.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. (1997b). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624):493-495.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 18(9):3206-3212.

Kerever, A., Schnack, J., Vellinga, D., Ichikawa, N., Moon, C., Arikawa-Hirasawa, E., Efron, J.T. y Mercier, F. (2007). Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells*, 25:2146-2157.

Kheirbek, M.A. y Hen, R. (2013). (Radio)active neurogenesis in the human hippocampus. *Cell*, 153(6):1183-4.

Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H. y Inokuchi, K. (2013). Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell*, 139(4):814-27.

Kokoeva, M.V., Yin, H. y Flier, J.S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*, 310: 679 – 683.

Kornack, D.R. y Rakic, P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96(10): 5768-5773.

Kron, M.M., Zhang, H. y Parent, J.M. (2010). The developmental stage of dentate granule cells dictates their contribution to seizure-induced plasticity. *Journal of Neuroscience*, 30(6):2051 -2059.

Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. y Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age related decrease of neuronal progenitor proliferation. *Journal of Neuroscience*, 16(6): 2027-2033.

Kuhn, H.G., Palmer, T.D. y Fuchs, E. (2001). Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 251:152-8.

Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J. y Gage, F.H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience*, 17:5820-5829.

Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L.B., O'Brien, T.F., Kusakabe, M. y Steindler, D.A. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Experimental Neurology*, 156:333-44.

Kulkarni, V.A., Jha, S. y Vaidya, V.A. (2002). Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 16: 2008-12.

Laplagne, D.A., Espósito, M.S., Piatti, V.C., Morgenstern, N.A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F.H. y Schinder, A.F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biology*, 4(12):e409.

Lee, J., Duan, W. y Mattson, M.P. (2002a). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *Journal of Neurochemistry*, 82(6):1367-1375.

Lee, J., Duan, W., Long, J.M., Ingram, D.K. y Mattson, M.P. (2000). Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 15(2):99-108.

Lee, J., Seroogy, K.B. y Mattson, M.P. (2002b). Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Journal of Neurochemistry*, 80(3):539-47.

Lehn, H., Steffenach, H.A., van Strien, N.M., Veltman, D.J., Witter, M.P. y Haberg, A.K. (2009). A specific role of the human hippocampus in recall of temporal sequences. *Journal of Neuroscience*, 29:3475-3484.

Li, Y., Aimone, J.B., Xu, X., Callaway, E.M. y Gage, F.H. (2012). Development of GABAergic inputs controls the contribution of maturing neurons to the adult hippocampal network. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109: 4290-4295.

Lie, D.C., Dziewczapolski, G., Willhoite, A.R., Kaspar, B.K., Shults, C.W. y Gage, F.H. (2002). The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *Journal of Neuroscience*, 22:6639-6649.

Lindqvist, A., Mohapel, P., Bouter, B., Frielingsdorf, H., Pizzo, D., Brundin, P. y Erlanson-Albertsson, C. (2006). High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *European Journal of Neurology*, 13(12):1385-8.

Lledo, P.M., Gheusi, G. y Vincent, J.D. (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiological Reviews*, 85:281-317.

Llorens-Martín, M., Tejeda, G.S. y Trejo, J.L. (2010). Differential regulation of the variations induced by enviromental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis. *PLos One*, 5(8):e12188.

Lois, C. y Álvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90:2074-77.

Ma, D.K., Marchetto, M.C., Guo, J.U., Ming, G.L., Gage, F.H. y Song, H. (2010). Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nature Neuroscience*, 13:1338 -1344.

Madsen, T.M., Treschow, A., Bengzon, J., Bolwig, T.G., Lindvall, O. y Tingström, A. (2000). Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biological Psychiatry*, 47(12): 1043-1049.

Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J. y Duman, R.S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20(24): 9104-9110.

Marín-Burgin, A. y Schinder, A.F. (2012). Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behaviour Brain Research*, 227(2):391-9.

Markakis, E.A. y Gage, F.H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *Journal of Comparative Neurology*, 406(4):449-60.

Markakis, E.A., Palmer, T.D., Randolph-Moore, L., Rakic, P. y Gage, F.H. (2004). Novel neuronal phenotypes from neural progenitor cells. *Journal of Neuroscience*, 24:2886-2897.

McDonald, H.Y. y Wojtowicz, J.M. (2005). Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience letters*, 385: 70-5.

McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276:66-7.

Mercier, F., Kitasako, J.T. y Hatton, G.I. (2002). Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *Journal of Comparative Neurology*, 451(2):170-88.

Ming, G.L. y Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28:223-50.

Ming, G.L. y Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70:687–702.

- Mirescu, C. y Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16(3): 233-238.
- Monje, M.L., Toda, H. y Palmer, T.D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*, 302(5651): 1760-1765.
- Mu, Y. y Gage, F.H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 6:85.
- Nacher, J., Rosell, D.R., Alonso-Llosa, G. y McEwen, B.S. (2001). NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 13(3):512-520.
- Nakagawa, E., Aimi, Y., Yasuhara, O., Tooyama, I., Shimada, M., McGeer, P.L. y Kimura, H. (2000). Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia*, 41(1): 10-18.
- Nicolas, M. y Hassan, B.A. (2014). Amyloid precursor protein and neural development. *Development*, 141(13):2543-8.
- Noble, M. y Dietrich, J. (2004). The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 27(3): 148-154.
- O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, 51:78-109.
- O'Keefe, J. y Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34:171-175.
- Ormerod, B.K. y Galea, L.A. (2001). Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. *Neuroscience*, 102:369-79.
- Pallotto, M. y Deprez, F. (2014). Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABAA-receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8:166.
- Palmer, T.D., Ray, J. y Gage, F.H. (1995). FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 6(5): 474-486.

- Palmer, T.D., Willhoite, A.R. y Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 425: 479–494.
- Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S. y Lowenstein, D.H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 17(10):3727-3738.
- Park, H.R. y Lee, J. (2011). Neurogenic contributions made by dietary regulation to hippocampal neurogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1229:23-8.
- Paton, J.A. y Nottebohm, F. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*, 225(4666): 1046-1048.
- Pérez-Domper, P., Gradari, S. y Trejo, J.L. (2013). The growth factors cascade and the dendrito-/synapto-genesis versus cell survival in adult hippocampal neurogenesis: the chicken or the egg. *Ageing research reviews*, 12(3):777-85.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P.R. y McEwen, B.S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 17:879-886.
- Price, J., Turner, D. y Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:156-60.
- Rai, K.S., Hattiangady, B. y Shetty, A.K. (2007). Enhanced production and dendritic growth factor of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF2 infusions. *European Journal of Neuroscience*, 26:1765-1779.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., Wei, J., Dilley, G., Pittman, S.D., Meltzer, H.Y., Overholser, J.C., Roth, B.L. y Stockmeier, C.A. (1999). Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biological Psychiatry*, 45(9): 1085-1098.
- Rao, M.S. y Shetty, A.K. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 19(2): 234-246.
- Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A. y Lesch, K.P. (2006). Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Molecular Psychiatry*, 11(5): 514-522.

Reynolds, B. A. y Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052): 1707-1710.

Saeed, Y., Xie, B., Xu, J., Wang, H., Hassan, M., Wang, R., Hong, M., Hong, Q., Deng, Y. (2014). Indirect effects of radiation induce apoptosis and neuroinflammation in neuronal SH-SY5Y cells. *Neurochemistry Research*, 39(12):2334-42.

Sandoval, C.J., Martínez-Claros, M., Bello-Medina, P.C., Pérez, O. y Ramírez-Amaya, V. (2011). When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? *PLoSOne*, 6(3):e17689.

Sanes, J.R., Rubenstein, J.L. y Nicolas, J.F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study postimplantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO journal*, 5:3133-3142.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C. y Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301(5634): 805-809.

Schmidt-Hieber, C., Jonas, P. y Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988):184-7.

Scoville, W.B. y Milner, B. (2000). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences*, 12:103-113.

Seki, T. y Arai, Y. (1995). Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport*, 6(18): 2479-2482.

Seri, B., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S. y Álvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 21(18): 7153-7160.

Sheline, Y. I. (1996). Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Molecular Psychiatry*, 1(4): 298-299.

Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K. y Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*, 304: 1338–1340.

Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T. y Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410(6826):372-376.

- Sidman, R.L., Miale, I.L. y Feder, N. (1959). Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogénesis in the nervous system. *Experimental Neurology*, 1:322-33.
- Silbereis, J.C., Huang, E.J., Back, S.A. y Rowitch, D.H. (2010). Towards improved animal models of neonatal white matter injury associated with cerebral palsy. *Disease Models & Mechanisms*, 3:678-688.
- Snyder, J.S. y Cameron, H.A. (2012). Could adult hippocampal neurogenesis be relevant for human behavior? *Behaviour Brain Research*, 227(2):384-90.
- Snyder, J.S., Radik, R., Wojtowicz, J.M. y Cameron, H.A. (2009). Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus*, 19, 360-370.
- Son, Y., Yang, M., Wang, H., Moon, C. (2015). Hippocampal dysfunctions caused by cranial irradiation: a review of the experimental evidence. *Brain Behaviour Immunity*, 45:287-96.
- Song, H., Stevens, C.F. y Gage, F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417:39-44.
- Stanfield, B.B. y Trice, J.E. (1988). Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Experimental Brain Research*, 72:399-406.
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H. y Kempermann, G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 54:805-14.
- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M.D., Reuter, K. y Kempermann G. (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*, 46(1):41-52.
- Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S. y Moser, E.I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10):655-69.
- Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Ray, J. y Gage, F.H. (1996). Differentiation of adult hippocampus derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature*, 383:624-7.
- Takagi, Y., Nozaki, K., Takahashi, J., Yodoi, J., Ishikawa, M. y Hashimoto, N. (1999). Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Research*, 831(1-2):283-287.

- Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J. y Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *Journal of Neuroscience*, 19:5792-801.
- Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H. y Schinder, A.F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature Neuroscience*, 11(8):901-7.
- Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H. y Gage, F.H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*, 10(6):727-34.
- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T. y Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47: 803–815.
- Tozuka, Y., Wada, E. y Wada, K. (2009). Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB Journal*, 23(6):1920-34.
- van der Kooy, D. y Weiss, S. (2000). Why stem cells? *Science*, 287:1439-41.
- van Praag, H., Kempermann, G. y Gage, F.H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2(3): 266-270.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875): 1030-1034.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C. y Gage, F.H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Journal of Neuroscience*, 25(38):8680-5.
- Vivar C y van Praag H. (2013). Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Frontiers of Neural Circuits*, 7:15.
- Wakade, C.G., Mahadik, S.P., Waller, J.L. y Chiu, F.C. (2002). Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 69(1): 72-79.
- Walker, M.C. y Semyanov, A. (2008). Regulation of excitability by extrasynaptic GABA(A) receptors. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 44: 29–48.

- Wang, L.P., Kempermann, G. y Kettenmann, H. (2005). A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 29(2): 181-9.
- Weissman, I.L., Anderson, D.J. y Gage, F.H. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17:387-403.
- Wentz, C.T. y Magavi, S.S. (2009). Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus. *Neuropharmacology*, 56(6-7):994-1000.
- Wiskott, L., Rasch, M.J. y Kempermann, G. (2006). A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 16(3):329-343.
- Wu, C.W., Chang, Y.T., Yu, L., Chen, H.I., Jen, C.J., Wu, S.Y., Lo, C.P. y Kuo, Y.M. (2008). Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *Journal of Applied Physiology*, 105(5):1585-94.
- Yoshimizu, T. y Chaki, S. (2004). Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315:493-6.
- Yuan, T-F., Liang, Y-X. y So, K-F. (2015). Occurrence of new neurons in the piriform cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8:167.
- Zhao, C., Deng, W. y Gage, F.H. (2008a). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132:645-660.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G. Jr., Ming, G.L. y Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 26(1): 3-11.



ANEXO 1:

Adult newborn neurons are involved in learning acquisition and long-term memory formation: The distinct demands on temporal neurogenesis of different cognitive tasks.

Suárez-Pereira, I. et al.

HIPPOCAMPUS (2015)

✓ MATERIAL SUPLEMENTARIO

Adult Newborn Neurons Are Involved in Learning Acquisition and Long-Term Memory Formation: The Distinct Demands on Temporal Neurogenesis of Different Cognitive Tasks

Irene Suárez-Pereira,¹ Santiago Canals,² and Ángel M Carrión^{1*}

ABSTRACT: There is evidence that adult hippocampal neurogenesis influences hippocampal function, although the role these neurons fulfill in learning and consolidation processes remains unclear. Using a novel fast X-ray ablation protocol to deplete neurogenic cells, we demonstrate that immature adult hippocampal neurons are required for hippocampal learning and long-term memory formation. Moreover, we found that long-term memory formation in the object recognition and passive avoidance tests, two paradigms that involve circuits with distinct emotional components, had different temporal demands on hippocampal neurogenesis. These results reveal new and unexpected aspects of neurogenesis in cognitive processes. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: neurogenesis; learning; memory; immature neuron maturation; hippocampus; consolidation

INTRODUCTION

In the hippocampal subgranular zone, progenitor cell division is responsible for the continuous production of new neurons in the adult hippocampus, a brain region that plays a central role in memory formation (Deng et al., 2010). The newborn granule cells generated from these dividing progenitors evolve through several stages of development to become mature granule cells that are indistinguishable from the granule cells born during embryonic development (Kempermann et al., 2004; Laplagne et al., 2006; Suh et al., 2007). Indeed, once sufficiently mature, these adult-generated neurons are known to be active in the formation and/or expression of memory (Kee et al., 2007; Tashiro et al., 2007; Trouche et al., 2009; Stone et al., 2011), indicating that they integrate into functional hippocampal networks. In experimental ani-

mals, long-lasting manipulations that augment (physical activity or environmental enrichment) or diminish (aging and stress) the number of newborn granule cells are associated with improved or impaired cognitive performance, respectively (Kempermann et al., 1997; Gould et al., 1999; van Praag et al., 2005; Montaron et al., 2006). Many studies have attempted to identify an association between hippocampal neurogenesis and cognitive processes using transgenic mice, as well as pharmacological and irradiation-based approaches (Kim et al., 2012). However, these studies involve the manipulation of neurogenesis over long periods (several weeks) and although they have produced correlative evidence of cognitive impairment, the role of adult newborn neurons in the different phases of learning and memory has not been determined. Here, we address this issue directly using a protocol that rapidly impedes adult hippocampal neurogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The male Swiss mice used in this study (5- to 6-weeks-old) were purchased from an authorized provider (University of Seville, Seville-Spain, or Janvier, France) and they were habituated to standard animals housing conditions for 2–3 weeks (a 12 h light/dark cycle, temperature, and humidity). The behavioral studies were performed when the mice reached 8 weeks-of-age. All experiments were performed in accordance with European Union guidelines (2010/63/EU) and Spanish regulations for the use of laboratory animals in chronic experiments (BOE 67/8509-12, 1988), and with the approval of the local institutional animal care committees.

X-Ray Irradiation

The mice were immobilized in a plastic cylinder and positioned in the X-ray irradiation apparatus (MBR-1505R, HITACHI). Animals were irradiated at 150 kV and 5 mA with a lead shield covering their entire body, except the head. The radiation was administered for about 30 min at an approximate

¹ Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Carretera de Utrera Km 1, 41013, Sevilla, Spain; ² Instituto de Neurociencias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Spain.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: DGICYT; Grant numbers: BFU2008-01552; BFU2011-27207; CSD2007-00023; BFU2012-39958; Grant sponsor: Fundación Ramón Areces; Grant sponsor: University Pablo de Olavide fellowship.

*Correspondence to: Ángel M. Carrión, División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide, Ctra. de Utrera Km 1, 41013 Sevilla, Spain. E-mail: amancar@upo.es

Accepted for publication 13 August 2014.

DOI 10.1002/hipo.22349

Published online 20 August 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

dose of 0.35 Gy/min, and at a source-to-skin distance of 13 cm, delivering a total of 10 Gy. Control animals were litter-mates handled similarly but not irradiated.

Cannulation and Drug Infusion

Mice were anesthetized with a 4% chloral hydrate solution (10 μ l/kg of body weight, i.p.) and when fully anesthetized, they were situated in a stereotactic frame. To inactivate the majority of the hippocampus, two pairs of stainless-steel guide cannulae were implanted bilaterally into the dorsal and ventral hippocampus of the mice according to the following stereotactic coordinates: Dorsal, AP = -2.0 mm, ML = \pm 1.4 mm, V = -1.3 mm; and Ventral, AP = -3.2 mm, L = \pm 2.8 mm, V = -3.25 mm from the bregma. The mice were then allowed to recover for at least 7 days. To transiently inactivate hippocampal activity, an inhibitory cocktail was prepared in PBS that contained tetrodotoxin (TTX [Tocris]: a sodium channel blocker, 20 μ M) and 6-cyano-7-nitroquinoxaline (CNQX [Tocris]: a selective antagonist of AMPA receptors, 3 mM). The mice received infusions of 0.5 μ l of the TTX-CNQX cocktail or PBS alone 30 min prior to the memory test, delivered through each cannula at a rate of 0.2 μ l/min. The injection syringe (Hamilton) was left in place for 1 min following infusion.

Electrophysiology

Electrode implantation

Mice were anesthetized with urethane (1.8 g/kg, i.p.) 24–48 h after irradiation and they were then secured in a stereotaxic device, maintaining their body temperature at 37°C using a rectal probe and a heating pad. Stimulating electrodes were implanted using standard surgical and stereotaxic procedures, as described previously (Canals et al., 2005a, b). A concentric bipolar electrode (World Precision Instruments, US) was positioned in the perforant pathway (from bregma: -4.2 mm anteroposterior and 2.5 mm lateral, 1–1.5 mm ventral to the dural surface) for orthodromic stimulation of the dentate gyrus and the hippocampus proper. Charge balanced biphasic 0.1 ms pulses were delivered using a constant current source and a pulse generator (STG2004, Multichannel Systems, Reutlingen, Germany). The recording electrodes used were silicon electrode arrays (single shank, 32 channels; Neuronexus Technologies, US) implanted into the hippocampus (2.1 mm caudal and 1.2 mm lateral from bregma to record across different CA1 and dentate gyrus levels in the dorsal hippocampus) and prefrontal cortex (PFC) (1.7 mm rostral and 0.3 mm lateral from bregma), both ipsilateral to the stimulated perforant pathway. The final location of the hippocampal recording was adjusted and standardized between experiments based on the spatio-temporal profile of the potentials evoked during perforant path stimulation. Probes were preimmersed in a DiI solution in order to confirm the precise localization of the recording in sections of the postmortem brains.

Hippocampus

Stimulation protocols

Test stimulation for electrophysiological recording consisted of single pulses (current balanced biphasic pulses 0.1 ms width each phase, cathodal leading) with different current intensities (Input–Output curves), and trains of 10 pulses at 1 Hz at current intensities that produced half-maximal amplitude population spikes (PS) in the dentate gyrus (DG).

Evoked potentials and spontaneous on-going activity was recorded. After filtering (0.1 Hz–3 kHz) and amplification, the electrophysiological signals were digitalized (20 kHz acquisition rate) and stored on a computer for offline processing with Spike2 and our own software developed in MATLAB. The PS in the hilus of the DG and the pyramidal cell layer of CA1 were measured as the amplitude from the precedent positive crest and the negative peak, while the excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) were measured as the maximal slope of the falling potentials recorded in the molecular layer and *stratum radiatum*, respectively. The power of the spontaneous electrophysiological signals was computed for specific frequency bands (delta 0.5–4 Hz, theta 4–8 Hz, alpha 8–12, beta 12–30 Hz, and gamma 30–100 Hz). At the end of these experiments the animals were perfused transcardially with 4% PFA and 100 μ m vibratome sections were counterstained with DAPI to visualize the position of the recording electrodes.

Behavioural Tests

Motor and exploratory activity in the open field

To evaluate motor activity the mice were placed in an open field for 15 min (38 \times 21 \times 15 cm³, Cybertec S.A.). This apparatus consists of a walled platform that contains infrared (IR) emitters and sensors coupled to an actimeter, and the movement sensor was connected to a computer that recorded the number of times the mouse interrupted the IR beams/min. Exploratory activity, was determined through the time of interaction with two different objects in a 15 min session. These parameters gave us a measure of the animal's visual and olfactory capacities.

Learning and memory (general considerations)

We used two different protocols to study how neurogenesis influences learning and memory. To obtain optimal long-term memories, we followed extended training protocols: a long training period (15 min) in the object recognition (OR) test; and prolonged electrical shock stimulation (5 s) in the passive avoidance (PA) test. In our hands, shorter exploration or stimulation times did not produce consistent long-term memories 3 or 8 days later in the OR and PA tests, respectively. Moreover, retention was weaker when the retention test was performed at times longer than 3 or 8 days after OR or PA, respectively (Romero-Granados et al., 2010; and personal observation).

Object recognition memory

Mice were tested in a rectangular arena (55 \times 40 \times 40 cm³) located in a room with dim lighting and constant background

noise. Two identical objects were placed in the arena during the training phase of the OR protocol. Subsequently, the animal's memory of one of the original objects was assessed by comparing the amount of time spent exploring the novel object as compared with that spent exploring the familiar one. The objects were plastic pieces of different shapes and they were cleaned thoroughly with 70% ethanol between trials to remove any olfactory cues. Before the experiment, mice were habituated to the arena for 20 min in the absence of the objects on 2 consecutive days. On the training day, the mice were allowed to explore the two identical objects for 15 min. Retention tests were then performed at the times indicated after the training session by returning the mice to the arena for a 10 min session having randomly exchanging one of the familiar objects for a novel one. The time spent exploring each object was recorded and the relative exploration of the novel object was expressed as a discrimination index $[DI = (t_{\text{novel}} - t_{\text{familiar}})/(t_{\text{novel}} + t_{\text{familiar}})]$. The criteria for exploration were based strictly on active exploration, defined as directing the nose toward the object at a distance of ± 1.5 cm and/or touching the object with the nose or vibrissae. Circling or sitting on the object were not considered exploratory behaviors. Importantly, the exploration times in training sessions for the OR test were no different for irradiated mice with respect to sham mice (Supporting Information Table 1). All trials were performed by an experimenter blind to the drug treatments and/or manipulations.

Step-through passive avoidance test

Mice have an innate preference for dark and enclosed environments. In the habituation phase, the mice were handled and allowed to move freely for 1 min in a chamber ($47 \times 18 \times 26$ cm³, manufactured by Ugo Basile) that was divided equally into one light and one dark compartment (each measuring $28.5 \times 18 \times 26$ cm³). In the training phase, the mice were briefly confined to the light compartment and then 30 s later, the door separating the dark–light compartments was opened. Once mice entered the dark compartment, the door closes automatically and the mice received an electrical stimulation (0.5 mA, 5 s) that was delivered through the metal floor. In the retention tests performed at the times indicated, the mice that recalled the electrical shock experience when again placed in the dark compartment of the apparatus avoided or at least took longer to enter the dark compartment during the test. Thus, the latency to enter into a dark compartment (escape latency) is a measure of information learning or memory retention depending on how long after the training session the test was carried out. To compare the results obtained in different experiments, the fold change in escape latency with respect to the latency obtained in the training session is represented.

Motor learning test

The rotarod (Ugo Basile Biological Research Apparatus) consists of a gritted plastic roller (3 cm in diameter, 6 cm long)

flanked by two round plates to prevent the animal from escaping (30 cm in diameter). To habituate mice to the rotarod, the animals were placed on the roller at a speed of 20 rpm for 300 s. To assay motor learning, animals were subjected to four 300 s sessions in one day, with the roller accelerating up to 60 rpm. The number of trials required for the animals to remain for 300 s on the cylinder was measured in each session. The retention test was performed on the following day and it involved one session identical to the learning session.

Immunohistochemistry, Immunofluorescence, and Histological Analysis

For immunohistochemistry (IHC), antibodies against calbindin (1:3,000, Swant), nestin (1:250, Genetex) and doublecortin (dcx, 1:500, Santa Cruz) were used. For immunofluorescence (IF), an antibody against Iba1 (1:500, Wako) was used. Antibody staining for IHC was visualized with H₂O₂ and diaminobenzidine, and for IF with an Alexa Fluor 594-conjugated donkey antirabbit antibody (1:500, Invitrogen). To minimize variability, at least two sections from the rostral (from -1.58 to -2.06 mm respect to Bregma) and caudal (from -2.92 to -3.50 mm to Bregma) hippocampus were analyzed per animal under a bright-field DMRB RFY HC microscope (Leica) for IHC or a fluorescence confocal SPE DM 2500 microscope (Leica) for IF. In each section, the total number of positive cells and the dentate gyrus area was quantified using Image-J software (downloaded as a free software package from the public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

Statistical Analysis

The results were analyzed using the SPSS package for Windows and unless otherwise stated, the data are represented as the mean \pm SEM values. The data were analyzed with one-way and two-way ANOVA, and the *t*-test was used for *post hoc* comparisons.

RESULTS

A Unique X-Ray Irradiation Provokes Transient Depletion of Adult Hippocampal Neurogenesis

To determine whether adult newborn granule cells are required to carry out hippocampal-dependent cognitive processes, we developed a method to eradicate neurogenesis in awake, movement restricted mice by local X-ray irradiation of the brain. Immunohistochemical analysis of the hippocampus from non-irradiated mice and those sacrificed 6 h after irradiation highlighted the loss of $85.44 \pm 4.44\%$ of nestin cells (Figs. 1A3 and 1B3; and Supporting Information Fig. 1A) and $93.86 \pm 2.95\%$ of doublecortin cells (DCX: Figs. 1A4 and 1B4), with no effect on the mature granular calbindin positive cells of the dentate gyrus (Figs. 1A1, 1A2, 1B1, and 1B2). In addition, the subventricular zone, another neurogenic niche,

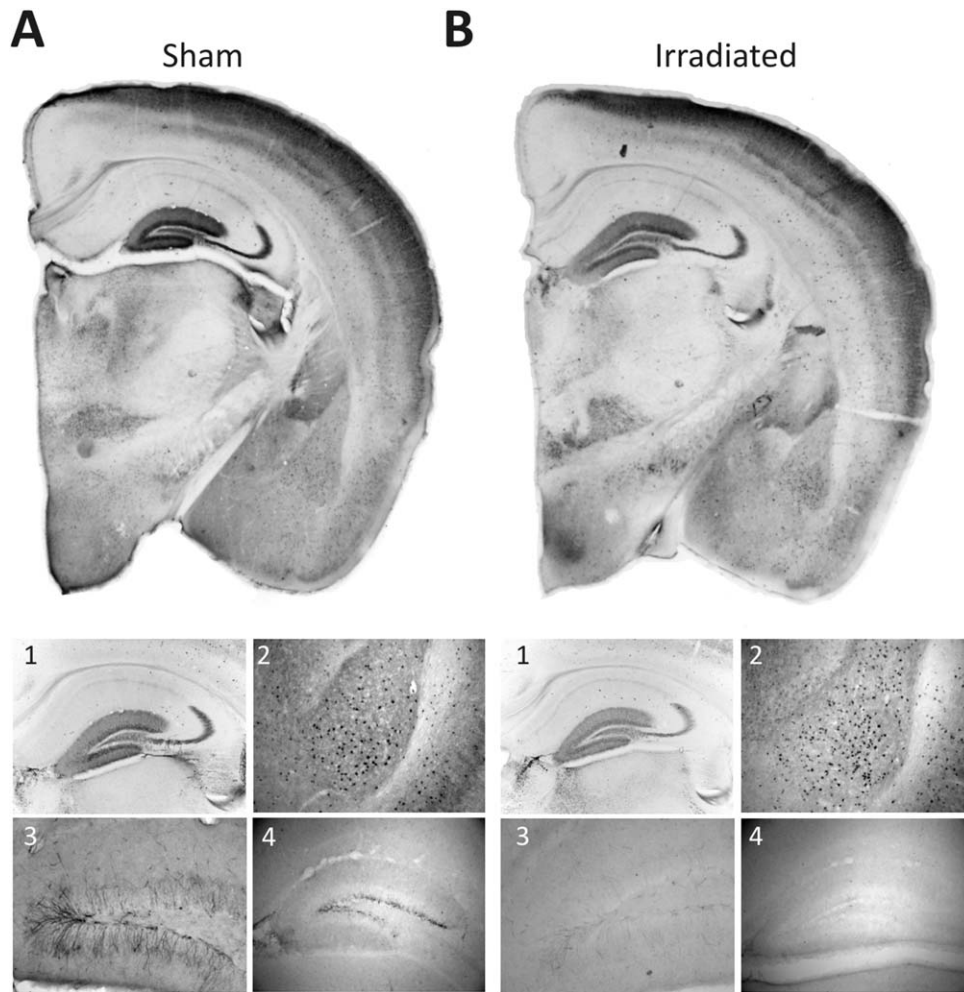


FIGURE 1. X-ray irradiation in vigilant mice ablates adult newborn neurons in 4–6 h. **A** and **B**, Immunohistochemical analysis of calbindin (hemibrain, hippocampus [1], and amygdala [2]), nestin (3) and doublecortin (DCX, 4) in the brain of sham (**A**) and irradiated (**B**) mice. Representative microphotographs show a reduction of more than 85% in the markers of precursors (nestin) and immature neurons (DCX) in irradiated mice ($n = 6$ mice/group).

was also affected by irradiation. Importantly, irradiation-dependent depletion of adult neurogenesis persisted for at least 7 days, after which the cells expressing nestin were only $53.95 \pm 5.25\%$ of the nestin cells in the DG of sham mice (Supporting Information Fig. 1A). However, during the first week after irradiation there was no change in the different structures labeled by the calbindin antibody in the DG (axons, dendrite, and somas of granule cells: Supporting Information Figs. 1A,B). Moreover, the proliferation marker PCNA showed a U-shape distribution, reaching a minimum at 6 h and recovering 72 h after irradiation (Supporting Information Fig. 1C). Given the transient effect of our X-ray irradiation protocol on adult neurogenesis, we assessed whether this method preserved basal homeostasis in the tissue by measuring a battery of inflammatory markers between 6 and 72 h post-irradiation (iba1, cd68, cx3cr, tnfa, and il1b). None of the inflammatory markers studied were significantly altered by our irradiation protocol (Supporting Information Fig. 2), and furthermore,

irradiation did not affect caspase 3 expression, a marker of cell death. All this data, like those obtained previously with a similar protocol (Kitamura et al., 2009), suggest that our irradiation protocol only affected precursor and immature neurons, producing no side effects on mature neurons.

A Unique X-Ray Irradiation Protocol Preserves the Electrophysiological Properties of Neocortical Neurons

We characterized the electrophysiological properties of neocortical neurons *in vivo* and the effects that the irradiation protocol might have on them. Spontaneous and evoked neuronal activity was recorded in the CA1 region and DG of the hippocampal formation, and in the PFC, of mice irradiated 24–48 h previously (Fig. 2A). The power of the spontaneous oscillatory activity in these regions was measured for different frequency bands in control and irradiated mice, and no differences were

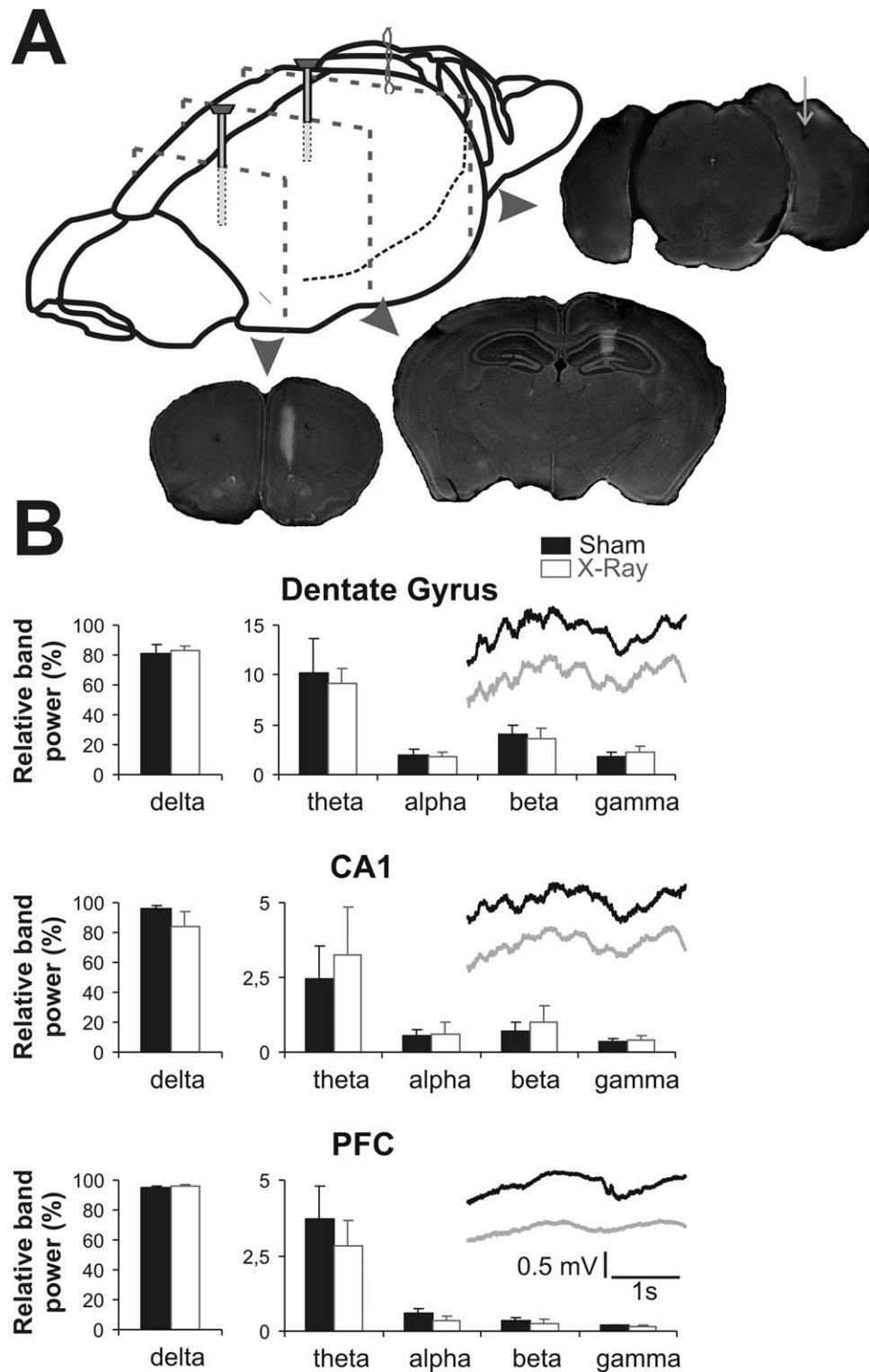


FIGURE 2. The X-ray irradiation protocol eliminates adult newborn neurons without affecting spontaneous electrophysiological activity in brain. (A) Schematic representation of the position of the electrodes. Micrographs represent DAPI-stained coronal brain sections covering the implantation positions, and showing the recording electrodes tracks (gray) and the lesion produced by the stimulating electrode (gray arrow). (B) Spontaneous electrophysiological activity in the dentate gyrus (upper panel), CA1

region (middle panel), and prefrontal cortex (PFC, lower panel) of sham (black traces and bars) and irradiated (gray traces and white bars) mice. Histograms represent the signal band power of the representative frequency bands (delta 0.5–4 Hz, theta 4–8 Hz, alpha 8–12, beta 12–30 Hz, and gamma 30–100 Hz) relative to the power of the broad band signals, and representative electrophysiological signals simultaneously recorded in the hilus of the dentate gyrus, the stratum radiatum of the CA1 and PFC.

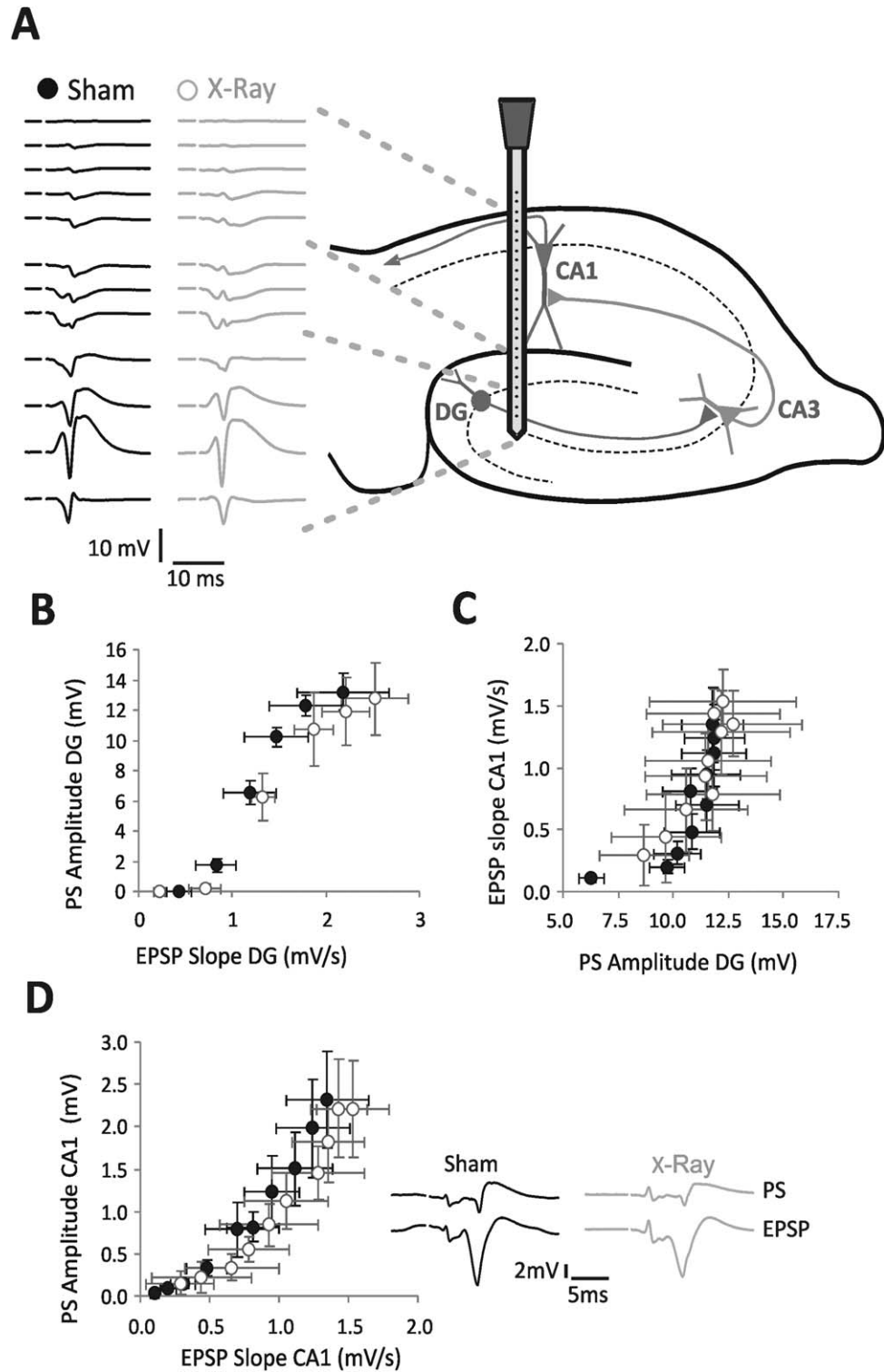


FIGURE 3. The X-ray irradiation protocol eliminates adult newborn neurons without affecting evoked electrophysiological activity in the hippocampus. (A) Hippocampal scheme and representative hippocampal recording profiles evoked by perforant path stimulation field potentials at different current intensities (from 50 to 1,000 μ A) or elicited with 1 Hz trains in sham (black circles and traces) and irradiated (open circles and gray

traces) mice. No changes were found in X-ray irradiated animals in terms of neuronal excitability (EPSP-PS) in the dentate gyrus (B), in the functional coupling between hippocampal subfields (C) or in the CA1 region (D). The inset in D shows amplified trisynaptic potentials recorded in the CA1 upon perforant path stimulation ($n=6$ and 5 for nonirradiated and irradiated mice, respectively).

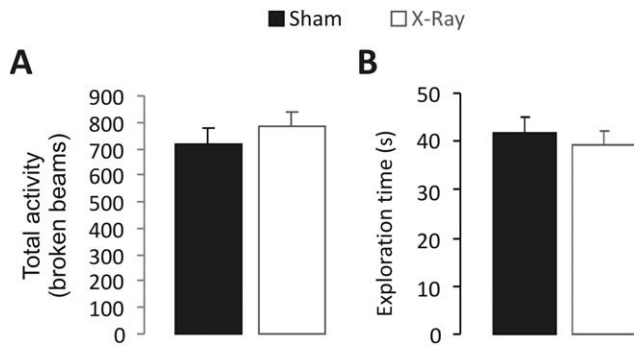


FIGURE 4. The locomotion and exploration of the mice is not affected 4 h after X-irradiation. (A) Nonstressful locomotion was tested in an open field apparatus. Locomotion is measured as the number of times the infrared beams are broken in 15 min. (B) Exploration was measured as the time of active object exploration in the 15 min ORM training session.

found for any of the frequency bands over the relevant power spectrum (Fig. 2B). To further investigate the electrophysiological properties of hippocampal networks, we measured the population synaptic and spiking responses (EPSPs and PS, respectively) of dentate granule cells and CA1 pyramidal neurons evoked by stimulation of the perforant pathway (Fig. 3A). Suprathreshold current pulses delivered to the perforant pathway evoked classical field potentials across the hippocampal subfields (inset in Fig. 3A). Specifically, a negative going potential recorded in the molecular layer of the DG, and representing the entorhinal monosynaptic afferent (EPSP-DG), was followed by granule cell population firing (PS) with maximum voltage amplitude in the centre of the hilus, and a trisynaptic EPSP in the *stratum radiatum* of the CA1 region (EPSP-CA1). The electrophysiological profile across hippocampal subfields was comparable in both, irradiated and sham animals. When single pulses of increasing current were applied to the perforant pathway (input–output curves), no qualitative or quantitative differences were found in the evoked potentials, demonstrating that the irradiation protocol did not affect basal transmission and neuronal excitability in the dentate gyrus (Fig. 3B). Furthermore, perforant path stimulation with trains at 1 Hz demonstrated that the functional coupling in the trisynaptic circuit (DG→CA3→CA1) was preserved in irradiated animals, measured as the relationship between the evoked PS in the dentate gyrus and the subsequent EPSP in the *radiatum* of CA1 (Fig. 3C). Finally, the neuronal excitability and basal transmission of CA1 pyramidal neurons was not significantly altered in the irradiated animals, measured as the CA1 PS evoked by a certain *stratum radiatum* EPSP (Fig. 3D). Together, these results suggest that the irradiation protocol did not perturb basal neuronal activity, consistent with the morphological observations.

A Unique X-Ray Irradiation Protocol Does Not Alter the Locomotor and Exploratory Activities of Mice

Given the specificity of our protocol in ablating immature neurons, and taking advantage of its fast and noninvasive

nature, we performed behavioral tests 3–4 h after irradiation, a time window not accessible with standard methods. We measured the exploratory activity of nonirradiated and irradiated mice in the open field and found no significant differences between these mice (Fig. 4). Thus, the morphological, electrophysiological, and behavioral data together demonstrate that the protocol developed here can be safely used to determine the role of adult precursors and immature neurons (newborn adult neurons) in each phase of hippocampal-dependent learning and memory.

Adult Hippocampal Neurogenesis Participates in Acquisition and Long-Term Memory in Hippocampal-Dependent Tasks

Learning and memory are complex processes that can be considered as two separate events: information acquisition and storage. To assess the role of adult newborn neurons in learning and memory processes, we used two hippocampal-dependent cognition paradigms: the OR and PA tests (Baarendse, 2008; Winters et al., 2008). To determine whether adult newborn neurons are required for learning (information acquisition), mice were irradiated 4 h before or just after the OR or PA training session, thereby eliminating immature neurons engaged in the early learning phase. When the short-term memory test (STM) was performed 4 h after the training session as an index of learning, poor discrimination indices were obtained in the OR (compare: 0.17 ± 0.02 and -0.05 ± 0.03 for sham and irradiated mice manipulated before training [$t(9) = 5.25$; $p < 0.001$]; and 0.19 ± 0.02 and -0.00 ± 0.04 for sham and irradiated mice manipulated after training [$t(9) = 3.86$; $p = 0.003$]) and low escape latencies (with respect to the escape latency in the training session) in the PA tests (compare: 7.31 ± 1.51 and 3.06 ± 0.61 for sham and irradiated mice manipulated before training [$t(15) = 2.59$; $p = 0.02$]; and 6.8 ± 1.39 and 2.41 ± 0.34 for sham and irradiated mice manipulated after training [$t(9) = 3.04$; $p = 0.008$]) with respect to nonirradiated mice (Fig. 5A).

Once information is acquired it must be consolidated in order to be stored. To investigate whether immature adult neurons participated in this consolidation phase, we irradiated mice after a STM performed 1 h after the learning session. We then carried out retention tests 24 h later for OR or 72 h later for PA (Fig. 5B). Compared with nonirradiated mice, the consolidation indices of the mice irradiated after the STM test were low (compare: 0.18 ± 0.03 and 0.01 ± 0.03 for sham and irradiated mice in OR [$t(9) = 3.17$; $p = 0.01$]; and 4.23 ± 0.35 and 2.43 ± 0.2 for sham and irradiated mice in PA [$t(11) = 4.40$; $p = 0.001$]). In addition, we studied learning consolidation in a nonhippocampal-dependent test, the motor coordination test. In these experiments the acquisition and consolidation of the nonirradiated and irradiated mice were indistinguishable (Fig. 5C). Together, these results suggest that adult neurogenesis participates in acquisition and consolidation of hippocampal-dependent memories.

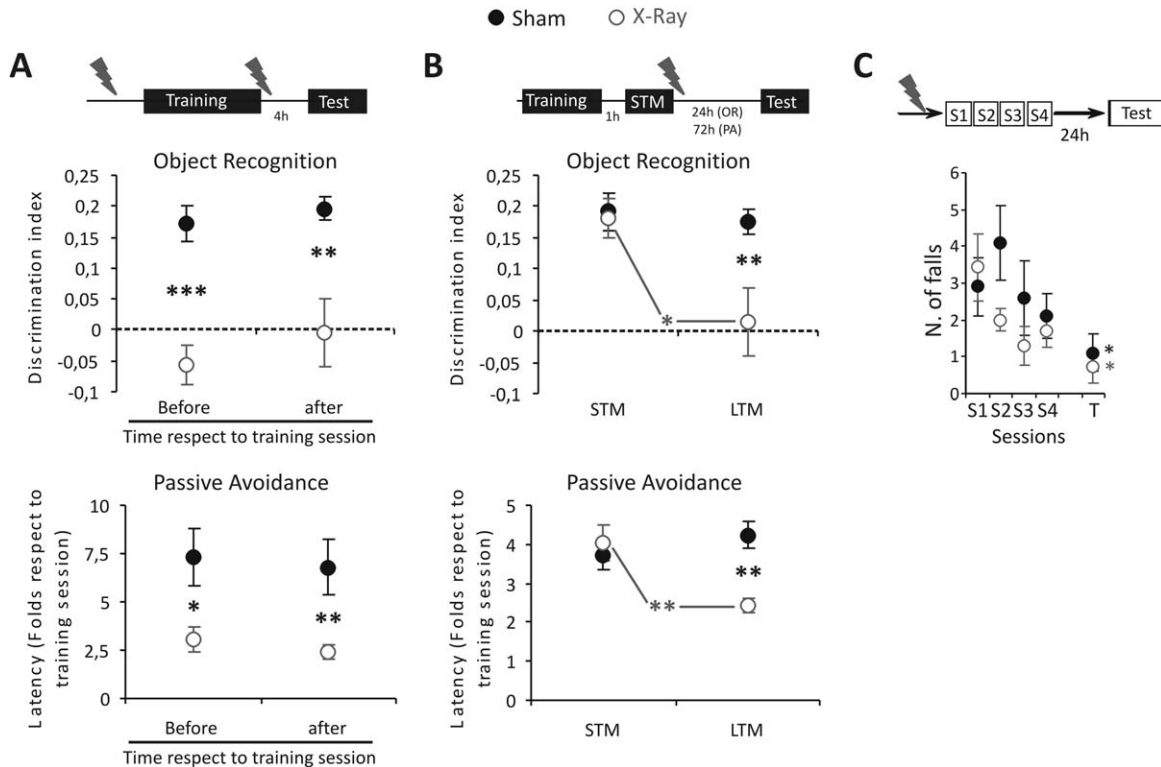


FIGURE 5. Newborn adult neurons are required for learning and consolidation of hippocampal-dependent memory. (A) X-ray irradiation before or just after the training session for object recognition memory (ORM) and passive avoidance (PA) impairs short-term memory (asan index of learning) when tested 4 h after the training session. (B) X-ray irradiation just after the short-term memory test, performed 1 h after the training session,

blocked the establishment of ORM, and PA long-term memory, as evident when tested 24 and 72 h later, respectively. (C) The impairment of adult neurogenesis does not affect motor learning acquisition and consolidation (* represents significant difference between the memory test and the first learning session for non-irradiated (black) and irradiated (gray) mice): * $p < 0.05$; and ** $p < 0.01$.

OR and PA Long-Term Memory Formation Require Different Temporal Demands on Newborn Adult Neurons

Finally, we wanted to assess the temporal relationship between the generation of adult newborn hippocampal neurons, and both OR and PA consolidation. OR long-term memory formation was studied 3 days after the training session and to test the temporal association with neurogenesis, mice were irradiated 24, 48, or 72 h after the training session and compared to nonirradiated mice. Mice displayed poor consolidation when irradiated 24 or 48 h after the training session (compare: 0.25 ± 0.04 and 0.00 ± 0.05 for sham and irradiated mice manipulated 24 h after training [$t(9) = 3.63$; $p < 0.005$]; and 0.21 ± 0.05 and 0.05 ± 0.02 for sham and irradiated mice manipulated 48 h after training [$t(9) = 2.50$; $p = 0.03$]; Fig. 6A). However, when the mice were irradiated 72 h after training and only 4 h before the consolidation test, the discrimination index was similar to that in the non-irradiated mice. A similar approach was adopted for the PA test but in this case long-term memory formation was evaluated 8 days after the training session and the mice were irradiated 5, 6, or 7 days after training. In sharp contrast to the OR memory results, the

consolidation index of mice irradiated 5 or 6 days after training in the PA test was still severely affected in irradiated mice (compare: 5.85 ± 1.11 and 1.71 ± 0.38 for sham and irradiated mice manipulated 5 days after training [$t(9) = 3.52$; $p = 0.006$]; and 6.68 ± 0.04 and 2.04 ± 0.39 for sham and irradiated mice manipulated 6 d after training [$t(9) = 11.72$; $p < 0.001$]; Fig. 6B). Importantly, when the mice were irradiated 7 days after the training session there were no differences between irradiated and nonirradiated mice.

The results presented above strongly suggested that different periods of adult newborn neuron maturation were required for OR and PA long-term memory formation. However, these results cannot rule out whether memory processes had already become independent of the hippocampus 3 days after OR training or 8 days after PA training, and therefore, if they were independent of either mature or newborn granule cells in the DG. To address this possibility, the hippocampus was inhibited pharmacologically by infusing a neuronal antagonists cocktail (TTX/CNQX) bilaterally into both the dorsal and ventral hippocampus 30 mins before the OR (Fig. 6C) or PA (Fig. 6D) consolidation test. In both cases, TTX/CNQX blocked retrieval in the long-term memory test, evidence that the process at this

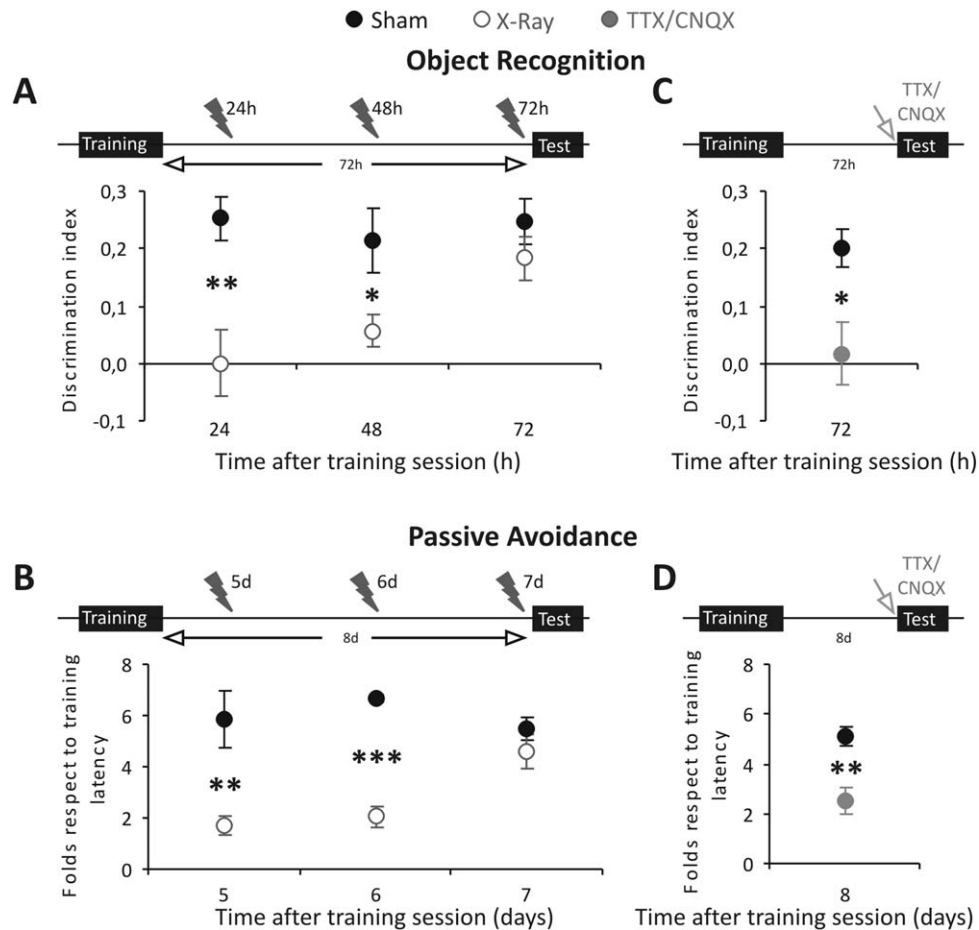


FIGURE 6. Long-term memory formation in the object recognition and passive avoidance tests requires different periods of newborn adult neuron. (A and B) Different temporal requirements of adult immature neurons in ORM (A) and PA (B) memory formation. The temporal course of X-ray irradiation is shown in the

upper panels. (C and D) At the time the retention test was performed (3 and 8 days after training session in ORM and PA trials, respectively), the functional role of the hippocampus in retrieval is shown by infusion of the TTX/CNQX cocktail: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$.

stage remains hippocampus-dependent, although it is independent of immature hippocampal neurons. In summary, all these results suggest that OR and PA consolidation require different periods of newborn adult neuron maturation and/or establishment of immature neuron states.

DISCUSSION

In the past decade, many studies have set out to establish the role of adult neurogenesis in learning and memory. In many of these studies, neurogenesis was interrupted during long periods of time and conflicting results were obtained (Marín-Burgin and Schinder, 2012). These controversies may be due to differences in the ablation protocol or cognitive paradigms used, or even in the alterations to compensatory neuronal circuits that result from the long-term inhibition of neurogenesis. For instance, a reduction in the inhibitory input

to granule cells in the DG has been demonstrated after 6 weeks of irreversible neurogenesis disruption, which may play a pivotal role in dentate synaptic plasticity compensation (Singer et al., 2011). Therefore, to determine the specific role of newborn adult neurons in each phase of learning and memory processes, a rapid and specific ablation protocol must be employed. Here we use an irradiation protocol that involves administering a single 10 Gy dose of radiation to vigilant mice at a very slow rate (0.35 Gy/min), which was intended to remove more than 85% of immature neurons within 4–6 h. This protocol allowed us to perform behavioral tests only a few hours after irradiation and moreover, the slow administration rate meant that mature neurons were not affected (Ben Abdallah et al., 2007; Kitamura et al., 2009). On the other hand, the protocol required a 30 min immobilization, although this potential stress did not appear to affect the behavior of sham irradiated mice.

Importantly, this ablation protocol did not perturb either resting or evoked electrophysiological activity, or motor and exploratory behaviors, suggesting that the basal activity of the

system is not affected by the protocol. Our electrophysiological results contrast with those obtained by long-term depletion of neurogenesis (Lacefield et al., 2012), which produced an increase in the amplitude of spontaneous γ -frequency bursts in the DG and hilus of mice, as well as enhanced synchronization of dentate neuron firing to these bursts. These contrasting electrophysiological observations again suggest that irreversible or long-term impairment of neurogenesis provokes compensatory alterations in hippocampal connections.

Using our X-ray ablation protocol we found that newborn neurons are required for learning and consolidation in two hippocampal-dependent learning paradigms: novel OR and a PA test. The results obtained are in partial accordance with recent reports where selective inactivation of 4-week-old immature neurons provoked only consolidation impairment (Gu et al., 2012). However, they contrast with the OR memory improvement observed following irreversible X-ray ablation of neurogenesis (Denny et al., 2012). The differences between the results obtained here and those presented elsewhere most likely reflect the different periods of immature neuron ablation and the concomitant presence of uncontrolled compensatory processes in the latter. However, an effect due to the different behavioral protocols used or even the mice strain on which the studies were performed cannot be fully ruled out.

Many studies of retrograde amnesia have shown that memory consolidation is initially dependent on the hippocampus during a cellular consolidation phase in which protein synthesis and cell signaling cascades are required. However, this dependency progressively decays over time in parallel with the gradually increasing engagement of the neocortex, a process known as systems consolidation (Alvarez and Squire, 1994; Dudai, 2004; Frankland and Bontempi, 2005; Wang and Morris, 2010; Álvarez-Salvado et al 2013). From studies in which the levels of neurogenesis were modulated in a distinct manner to inhibit or facilitate neurogenesis, a causal relationship between adult neurogenesis and the hippocampal-dependent period of associative fear memory was suggested (Kitamura et al., 2009). Indeed, when a protein required for the terminal maturation of newborn neurons is deleted, *erk5* (Pan et al., 2012a), remote memory expression is impaired (Pan et al., 2012b). Thus, the evidence available indicates that immature neurons participate in both cellular and systems consolidation of memories.

We studied the period in which newborn neurons are required for long-term memory formation in emotional (PA) and nonemotional (OR) hippocampal-dependent learning and memory tests. Our results unexpectedly indicate that both memory types have a different temporal requirement for newborn adult neurons, whereby PA requires newborn neurons for at least 7 days after the training session while OR memory only requires them for 3 days. These results may reflect the intersection of two processes spatially segregated in the hippocampus. On one hand, the segregation of newborn neuron maturation rates along the septo-temporal hippocampal axis (Piatti et al., 2011, and our results of nestin expression recovery after irradiation [Supporting Information Fig. 1A]), is faster in the septal than in the temporal pole. On the other, the dif-

ferential connectivity of the septo and temporal hippocampus (Sahay and Hen, 2007) provokes a segregation of hippocampal functions along the septo-temporal axis, emotional, and visuo-spatial sensory aspects of cognition dominating the temporal and septal pole of the hippocampus, respectively (Moser and Moser, 1998). In conjunction with other studies (reviewed in Fanselow and Dong, 2010), our data indicate that the DG and hippocampus can be functional segmented, whereby cognitive function is limited to the rostral area while emotional and affective functions are processed in the caudal area.

Taken together, and thanks to the rapid method for immature neuron ablation employed here, we have been able to define the need for newborn neurons in learning acquisition and consolidation of hippocampal-dependent learning and memory. We also show that in cognitive tests that exert demands on distinct circuits, long-term memory has different temporal requirements for neurogenesis. This is evident in terms of both the age of immature neurons and/or their maturation through the septo-temporal segregation of maturation and functional specialization in the hippocampus.

Author Contributions

I.S-P, S.C., and A.M.C. designed research; I.S-P performed research; I.S-P analyzed data; S.C. and A.M.C. wrote the article.

Acknowledgments

The authors thank Mrs Tatyana Rybkina for her assistance with the animal handling and maintenance; Begoña Fernández for her technical assistance; the animal facility at the Centro de Biología del Desarrollo (CABD) for help with the X-ray irradiation; and Dr M. Sefton for editorial assistance. The authors have no competing interests to declare.

REFERENCES

- Alvarez P, Squire LR. 1994. Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7041–7045.
- Alvarez-Salvado E, Pallarés V, Moreno A, Canals S. 2013. Functional MRI of long-term potentiation: imaging network plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20130152. doi: 10.1098/rstb.2013.0152.
- Baarendse PJ. 2008. Differential involvement of the dorsal hippocampus in passive avoidance in C57bl/6J and DBA/2J mice. *Hippocampus* 18:11–19.
- Ben Abdallah NM-B, Slomianka L, Lipp H-P. 2007. Reversible effect of X-irradiation on proliferation, neurogenesis and cell death in dentate gyrus of adult mice. *Hippocampus* 17:1230–1240.
- Canals S, Lopez-Aguado L, Herreras O. 2005a. Synaptically recruited apical currents are required to initiate axonal and apical spikes in hippocampal pyramidal cells: modulation by inhibition. *J Neurophysiol* 93:909–918.
- Canals S, Makarova I, López-Aguado L, Ibarz JM, Herreras O. 2005b. Longitudinal depolarization gradients along the

- somatodendritic axis of CA1 pyramidal cells: A novel feature of spreading depression. *J Neurophysiol* 94:943–951.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339–350.
- Denny CA, Nesha S, Burghardt NS, Schachter DM, Hen R, Drew MR. 2012. 4- to 6-week-old adult-Born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22:1188–1201.
- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51–86.
- Fanselow MS, Dong HW. 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7–19.
- Frankland PW, Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260–265.
- Gu Y, Arruda-Carvalho M, Wang J, Janoschka SR, Josselyn SA, Frankland PW, Ge S. 2012. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat Neurosci* 15:1700–1706.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. 2007. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* 10:355–362.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447–452.
- Kim WR, Christian K, Minga G-L, Song H. 2012. Time-dependent involvement of adult-born dentate granule cells in behaviour. *Behav Brain Res* 227:470–479.
- Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, Sekiguchi M, Sugiyama H, Inokuchi K. 2009. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* 139:814–827.
- Lacefield CO, Itskov V, Reardon T, Hen R, Gordon JA. 2012. Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus* 22:106–116.
- Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF. 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol* 4:e409. doi: 10.1371/journal.pbio.0040409.
- Marín-Burgin A, Schinder AF. 2012. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav Brain Res* 227:391–399.
- Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aourousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. 2006. Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol Aging* 27:645–654.
- Moser MB, Moser EI. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608–619.
- Pan Y-W, Zou J, Wang W, Sakagami H, Garelick MG, Abel G, Kuo CT, Storm DR, Xia Z. 2012a. Inducible and conditional deletion of extracellular signal-regulated kinase 5 disrupts adult hippocampal neurogenesis. *J Biol Chem* 287:23306–23317.
- Pan Y-W, Chan GCK, Storm DR, Xia Z. 2012b. Inhibition of adult neurogenesis by inducible and targeted deletion of ERK5 mitogen-activated protein kinase specifically in adult neurogenic regions impairs contextual fear extinction and remote fear memory. *J Neurosci* 32:6444–6455.
- Piatti V, Davies-Sala MG, Espósito MS, Mongiat LA, Trinchero MF, Schinder AF. 2011. The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J Neurosci* 31:7715–7728.
- Romero-Granados R, Fontán-Lozano A, Delgado-García JM, Carrión AM. 2010. From learning to forgetting: Behavioral, circuitry, and molecular properties define the different functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus* 20:584–595.
- Sahay A, Hen R. 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10:1110–1115.
- Singer BH, Gamelli AE, Fuller CL, Temme SJ, Parent JM, Murphy GG. 2011. Compensatory network changes in the dentate gyrus restore long-term potentiation following ablation of neurogenesis in young-adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5437–5442.
- Stone SSD, Teixeira CM, Zaslavsky K, Wheeler AL, Martínez-Canabal A, Wang AH, Sakaguchi M, Lozano AM, Frankland PW. 2011. Functional convergence of developmentally- and adult-generated granule cell in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus* 21:1348–1362.
- Suh HK, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. 2007. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515–528.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci* 27:3252–3259.
- Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C. 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5919–5924.
- Van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680–8685.
- Wang S-H, Morris RG. 2010. Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol* 61:49–79.
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. 2008. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1055–1070.

Inventory of Supplemental Information

Supplemental Figures

All Supplemental figures are related with Figure 1, and they show that our X-ray irradiation protocol does not affect to: mature neuron of dentate gyrus, and inflammatory processes.

Figure S1: X-ray irradiation impairs neurogenesis for at least 3 days. We show that irradiation protocol provoke a transient neurogenesis depletion without affect to mature neurons of dentate gyrus.

Figure S2: X-ray irradiation doesn't provoke a significant inflammatory response in the hippocampus.

Supplemental Experimental Procedures

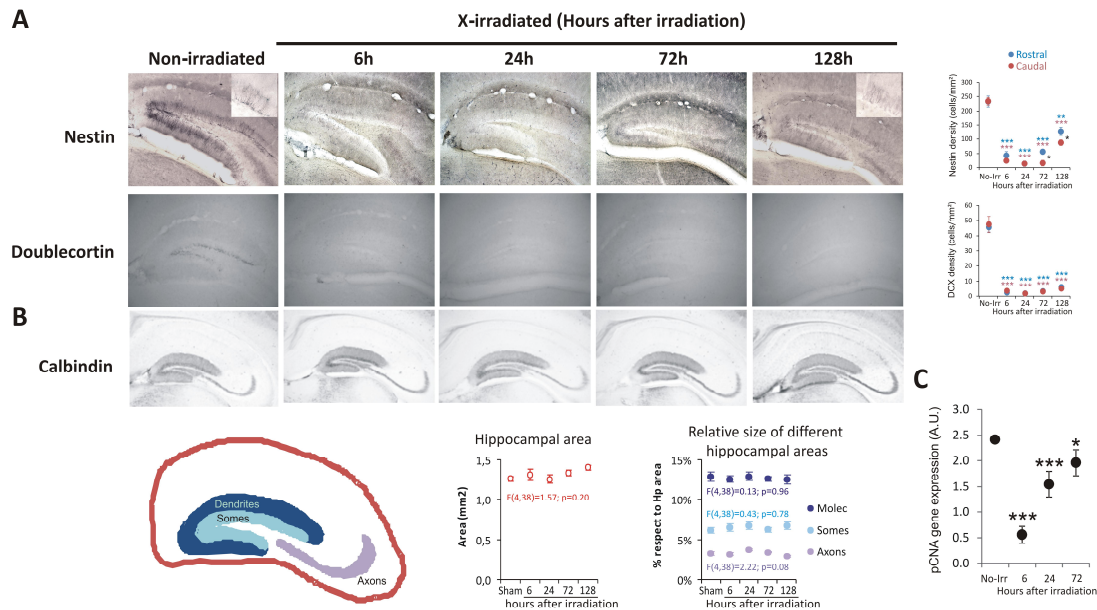
RT-PCR gene expression. We perform a detailed description of gene expression experiments presented in Figure S2 of supplemental material.

Supplemental Tables

Table S1 **Object exploration time (seconds) per session in the ORM experiments.** This table demonstrates that X-ray irradiation does not affect to mice exploratory activity. This table is related with Figure 1 and 2.

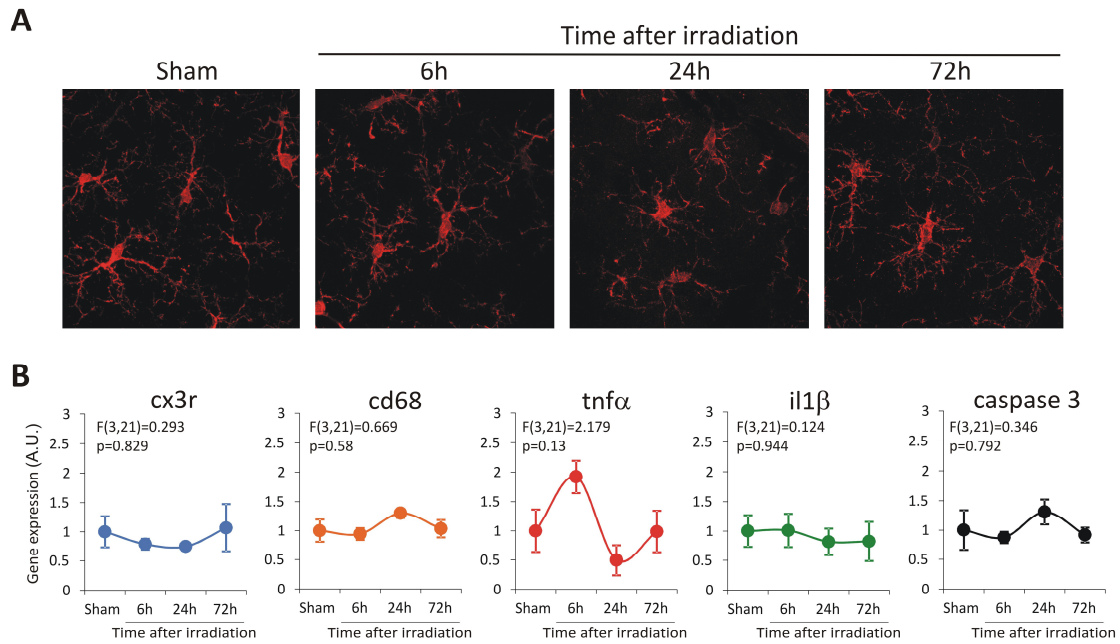
Table S2 **Primer sequences used for RT-PCR gene expression analysis.**

Supplemental Figures



Supplemental Figure 1. X-ray irradiation impairs neurogenesis for at least 3 days.

A, Representative microphotographs of immunohistochemistry for neural precursors (nestin), immature neurons (doublecortin, DCX) and mature neurons (calbindin) markers in the hippocampus of mice sacrificed 6, 24, 72 and 128 hours after irradiation and in non-irradiated mice (sham). Around 85% of nestin cells and more than 90% DCX cells were lost in the first three days after irradiation. The inset in some microphotographs shows nestin positive cells at a higher magnification. The density of nestin and DCX expressing cells in the rostral (red plot) and caudal (blue plot) dentate gyrus of the hippocampus in mice sacrificed 6, 24, 72 and 128 hours after irradiation, and in sham irradiated mice. **B**, Quantification of hippocampal surface and the relative area of the different part (dark blue, dendrites; light blue, somes; and lilac, axons) of calbindin positive neurons (granular cells) population in hippocampus of mice sacrificed 6, 24, 72 and 128 hours after irradiation and in sham mice. No alterations in any of the parameter were detected. **C**, PCNA gene expression in the hippocampus of mice sacrificed 6, 24, and 72 hours after irradiation and in sham irradiated mice. A transient loss of PCNA is observed during the first 72 hours. $n > 5$ mice per group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$.



Supplemental Figure 2. X-ray irradiation does not provoke significant inflammatory response in the hippocampus. A, Representative immunofluorescence microphotographs for the microglial marker Iba1 in the hippocampus of mice sacrificed 6, 24 and 72 hours after irradiation, and in non-irradiated (sham) mice. The number and morphology of microglial cells did not change after X-ray irradiation. **B,** Gene expression analysis of microglial marker activation (cd68, cx3cr, tnf α , and il1 β) and cell death (caspase 3) in the hippocampus of mice sacrificed 6, 24 and 72 hours after irradiation, and in sham mice. Only a non-significant weak and transient increase in tnf α gene expression is observed. $n > 5$ mice for sham groups and 4-5 mice for each of the irradiated groups.

Supplemental Experimental Procedures

Reverse transcription-PCR analysis of mRNA

Total RNA was extracted using the Tripure reagent (Roche Products) from the brain tissue of at least of six animals per group, collected from at least two different experimental sessions. More detailed information on the primers used can be found in Table S2. The values obtained were normalized with respect glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression and they are expressed relative to those of the non-irradiated animals to which a value of 1 was assigned.

Supplemental tables.

Table S1. Object exploration time (seconds) per session in the ORM experiments.

	Sessions			
Experiment	Training (T)	STM (learning)	LTM (consolidation)	n
Fig. 3a. The role of neurogenesis in learning				
Sham	42±5.32	36.4±2.69	--	5
X-ray 4h before T	39.2±4.62	35.8±6.16	--	5
Sham	55±12.19	33.6±7.61	--	5
X-ray just after T	56.5±9.08	36.5±3.23	--	5
Fig. 3b. The role of neurogenesis in long-term memory				
Sham	104.8±10.38	69±6.19	50.75±4.53	5
X-ray just after STM	101±5.45	58.8±7.16	41±1.47	5
Fig. 3c. Adult immature neuron temporal requirement for LTM formation				
Sham	75.2±5.04	--	41.8±3.27	5
X-Ray 24h after T	69±4.48	--	40.8±3.27	5
X-Ray 48h after T	61.5±8.39	--	44.25±4.55	5
X-Ray 72h after T	77±7.43	--	39.2±4.69	5
Fig. 3c. Hippocampal-dependent consolidation 72h after training				
Untreated	93.5±18.25	--	58.83±15.78	6
TTX/CNQX treatment	109.66±16.1	--	46.5±12.46	6

n, number of mice per group; T, training session; STM, short-term memory; LTM, long-term memory.

Table S2. Primer sequences used for RT-PCR gene expression analysis

gapdh-F	5'- GTAGGCCAAGTTGCCTTGTCCGT -3'
gapdh-R	5'- ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG -3'
cd68-F	5'- GGGGCTCTTGGGAACACTACAC-3'
cd68-R	5'- GTACCGTCACAACCTCCCTG-3'
cx3cr-F	5'- GCCTCTGGTGGAGTCTGCGTG-3'
cx3cr-R	5'- TGGGCTTCCGGCTGTTGGTG-3'
tnf α -F	5'- GGCAGGTCTACTTTGGGAGTCATTGC-3'
tnf α -R	5'- ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3'
il1 β -F	5'- AAAAGCCTCGTGCTGTCGGAC-3'
il1 β -R	5'- GCAGGGTGGGTGTGCCGTCT-3'
caspase 3-F	5'- TGGACTGTGGCATTGAGACAG-3'
caspase 3-R	5'- CGACCCGTCCTTTGAATTTC-3'
PCNA-F	5'- CTGCGACCGCAACCTAGCCA -3'
PCNA-R	5'- CGTGCAAATTCACCCGACGGC -3'

ANEXO 2:

Updating stored memory requires adult hippocampal neurogenesis.

Suárez-Pereira, I. & Carrión, AM.

SCIENTIFIC REPORTS (2015)

✓ MATERIAL SUPLEMENTARIO

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Updating stored memory requires adult hippocampal neurogenesis

Irene Suárez-Pereira & Ángel M Carrión

Received: 16 May 2015

Accepted: 13 August 2015

Published: xx xx xxxx

Adult hippocampal neurogenesis appears to influence hippocampal functions, such as memory formation for example. While adult hippocampal neurogenesis is known to be involved in hippocampal-dependent learning and consolidation processes, the role of such immature neurons in memory reconsolidation, a process involved in the modification of stored memories, remains unclear. Here, using a novel fast X-ray ablation protocol to deplete neurogenic cells, we have found that adult hippocampal neurogenesis is required to update object recognition stored memory more than to reinforce it. Indeed, we show that immature neurons were selectively recruited to hippocampal circuits during the updating of stored information. Thus, our data demonstrate a new role for neurogenesis in cognitive processes, adult hippocampal neurogenesis being required for the updating of stored OR memories. These findings suggest that manipulating adult neurogenesis may have a therapeutic application in conditions associated with traumatic stored memory, for example.

Following initial information acquisition, memory traces are committed to long-term memory through a consolidation process that stabilizes and stores the information acquired¹. Consolidation of hippocampal-dependent memories, such as object recognition memory (ORM), requires new protein synthesis over a defined time course^{2,3}. However, the efficiency of recovery of a consolidated ORM may show a time-dependent decrease³. Consolidated memories are not permanently fixed and they are malleable, susceptible to updating, strengthening or even loss due to further experiences⁴. Moreover, stabilization of a recalled memory relies on a further protein-dependent process called reconsolidation⁵.

Although consolidation and reconsolidation are processes that are conceptually similar and that share a dependence on protein synthesis, the brain regions and signalling pathways involved in these processes seem to differ^{3,6}. Adult hippocampal neurogenesis (AHN) is involved in the consolidation of hippocampal-dependent memories^{7,8}, yet the role of AHN in the reconsolidation of stored memories remains unclear. Here, using a protocol that rapidly ablates adult hippocampal precursors and immature neurons, we demonstrate that AHN is only required for object recognition memory reconsolidation when mice find novelty in a reactivation session. This notion is reinforced by the increase in the number of hippocampal immature neuron expressing Egr1, a molecular marker of neuron activation, after reactivation with novelty. Thus, these results associate AHN to the updating of stored memories.

Results

To determine whether adult neurogenesis is required to carry out hippocampal-dependent reconsolidation, we have used a local irradiation method developed previously to rapidly eradicate neurogenesis in vigilant, movement restricted mice (⁸, Fig. 1a and Fig. S1a). The brain irradiation protocol does not produce collateral effects on mature neurons (Fig. S1b) nor a neuroinflammatory response (Fig. S2), yet it allows us to perform behavioural tests 4–6 hours after irradiation, a time window not accessible with standard methods.

To study object recognition (OR) reconsolidation processes, mice were left for 15 minutes in a small area containing two objects. Three days later, a 10 minute reactivation (RA) session was performed and after a further 3 days, a post-reactivation long-term memory (PR-LTM) test was performed as a measure of reconsolidation (Fig. 1b–d). In these experiments neurogenesis was ablated after the RA session.

Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Carretera de Utrera Km 1, 41013 Sevilla, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to Á.M.C. (email: amancar@upo.es)

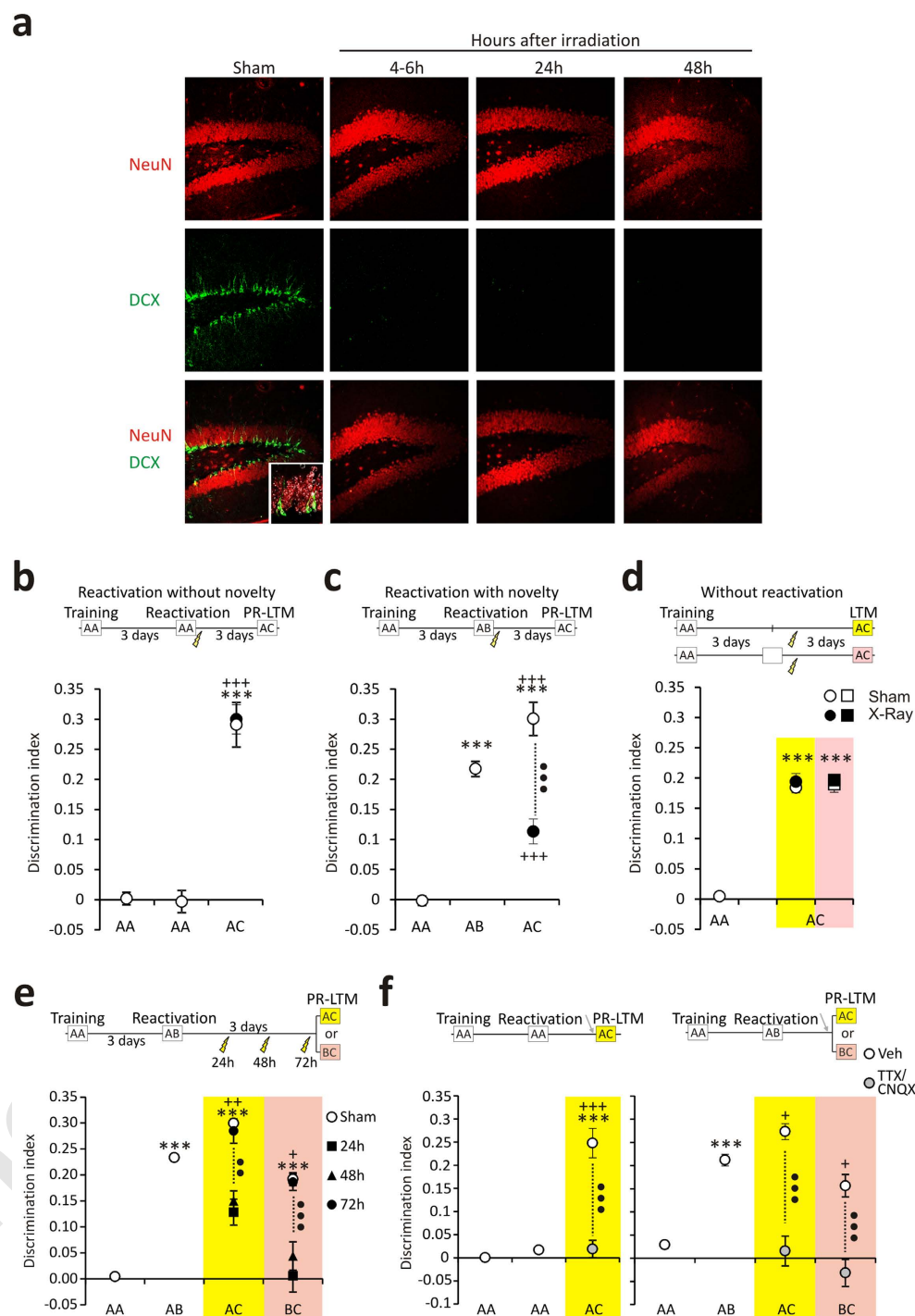


Figure 1. Adult hippocampal neurogenesis is required to update stored ORM. (a) Temporal effect of X-Ray irradiation on the immature, doublecortin (DCX) labelled hippocampal cells. (b–d) The effect of depleting adult neurogenesis on reconsolidation. Reconsolidation in sham and irradiated mice was compared in three different circumstances: (b) reactivation without novelty; (c) reactivation with novelty; and (d) no reactivation with or without context exposure. In all cases irradiation was performed 3 days after the OR training. (e) Differential temporal requirements for the maturation of adult immature neurons in ORM reconsolidation. The temporal course of X-irradiation in the ORM studies is shown in the upper panel. (f) The functional role of the hippocampus in PR-LTM retrieval is confirmed by infusion of the TTX/CNQX cocktail (orange shadows). In each graph, the letters A, B and C represent the different objects used; *represent significant differences between the sessions and the training session in the same experimental group; +represent significant differences between the LTM sessions and the reactivation session in the same experimental group; and • represent significant differences between the LTM session of each irradiated group with respect to the sham mice. A symbol, $p < 0.05$, two symbols, $p < 0.01$, and three symbols, $p < 0.001$.

When familiar objects were used in the RA session, no differences in the discrimination index (DI) were seen between training and RA sessions ($DI = 0.0 \pm 0.01$ and -0.01 ± 0.01 for the training and RA sessions, respectively). Also, when irradiation was performed after the RA session, the DI of irradiated mice was similar to that of sham mice in the PR-LTM ($DI = 0.29 \pm 0.04$ for sham mice and 0.27 ± 0.03 for irradiated mice [$t(14) = 0.54$; $p = 0.58$]; Fig. 1b). By contrast, when RA was performed with a novel object and a familiar object irradiated mice displayed a lower DI in the PR-LTM test than the sham mice ($DI = 0.29 \pm 0.01$ for sham mice and 0.11 ± 0.02 for irradiated mice [$t(17) = 8.23$; $p < 0.001$]; Fig. 1c). Finally, the effect of irradiation on reconsolidation required an object recognition RA session, since when the mice were only irradiated 3 days after the training session, or after an exploration session in the arena without objects, no change in the DI was evident in the PR-LTM test ($DI = 0.18 \pm 0.0$ for sham mice and 0.19 ± 0.01 for irradiated mice [$t(18) = 0.61$; $p = 0.54$], and $DI = 0.19 \pm 0.01$ and $DI = 0.19 \pm 0.00$ for sham and irradiated exploration mice, respectively [$t(11) = 0.46$; $p = 0.64$]; Fig. 1d). Interestingly, when the same experiment described above was performed but using a different context for the object RA session, similar results were obtained (Fig. S3). All these results suggested that AHN was involved in reconsolidation only when novel objects were presented in the RA session (i.e., when the original OR memory had to be modified).

We wanted to assess the temporal relationship between adult neurogenesis and OR reconsolidation. To test this temporal association, OR reconsolidation was studied using the same protocol described above but irradiating mice 24, 48 or 72 hours after the novelty RA session. Mice that were irradiated 24 or 48 hours after the RA session displayed poor reconsolidation compared to non-irradiated mice ($DI = 0.3 \pm 0.01$ for sham mice, and 0.12 ± 0.02 and 0.14 ± 0.02 , for mice irradiated 24 and 48 h after RA, respectively [$t(17) = 6.81$ and 6.83 for comparisons of sham mice with mice irradiated 24 h after RA and with mice irradiated 48 h after RA, respectively; $p < 0.001$ in both cases]; Fig. 1e), whereas the reconsolidation index of mice irradiated 72 hours after RA was similar to that of non-irradiated mice [$t(17) = 0.53$; $p = 0.62$]. To assess whether reactivation with novelty also caused new information storage, a PR-LTM session was performed with the novel object used in the RA session (now a familiar object) and a new object. Using this protocol, sham mice showed preference for the new object. In order to test the temporal association between neurogenesis and OR reconsolidation in this new protocol, mice were irradiated 24, 48 or 72 hours after the novelty RA session. As in the reactivation protocol described above, mice that were irradiated 24 or 48 hours after the RA session displayed poor reconsolidation compared to non-irradiated mice, whereas the reconsolidation index of mice irradiated 72 hours after RA was similar to that of non-irradiated mice [$DI = 0.19 \pm 0.01$, 0.12 ± 0.02 , 0.04 ± 0.02 and 0.18 ± 0.01 for the sham mice, and for the mice irradiated for 24, 48 and 72 h after RA, respectively [$t(14) = 5.82$, 5.17 and 0.29 for comparisons between sham and mice irradiated 24 h, 48 h or 72 h after RA, respectively; $p < 0.001$ for the first two comparisons and $p = 0.72$ for the last comparison]. These results suggested that OR memory reactivation requires neurogenesis (or at least the presence of some of the different neurogenic states) for at least 3 days after the RA session.

However, we could not be sure that reactivation process was hippocampal-dependent 3 days after OR training. To resolve this issue, we blocked hippocampal activity by locally administering a TTX/CNQX cocktail prior to the PR-LTM test (Fig. 1f). TTX/CNQX diminished the reconsolidation indices in all cases, evidence that this process is indeed hippocampal-dependent. These results indicated that OR reconsolidation requires immature neurons for at least 3 days after the RA session.

To obtain further evidence that AHN is involved in reconsolidation, we performed immunofluorescence studies to assess the distribution of Egr1, an immediate-early gene that is a marker of neuronal activity and circuit integration⁹ related to memory consolidation and reconsolidation¹⁰. Similarly, we evaluated the distribution of doublecortin (DCX), a prevalent marker of immature neurons in the dentate gyrus of non-trained, trained, non-reactivated and reactivated mice, with or without exposure to novelty (Fig. 2a,b). While little expression of Egr1 was detected in DCX⁺ cells in the unmanipulated ($0 \pm 0.5\%$), in the non-reactivated ($0.71 \pm 0.52\%$) and reactivated without novelty ($0.13 \pm 0.13\%$) mice, a significant increase in Egr1⁺/DCX⁺ cells was evident in mice sacrificed 1.5 h after training ($3.21 \pm 0.82\%$), as well as after the novelty RA session ($3.43 \pm 0.56\%$; Fig. 2c). These results suggest that hippocampal immature neurons are recruited to hippocampal circuits upon exposure to a novel feature in a familiar situation.

Discussion

Long-term memory formation not only requires the stabilization of learned information but also, the subsequent capacity to modify the stored memory trace by further related experiences. These events occur through two related mechanisms, known as consolidation and reconsolidation, respectively. The first studies into the cellular/molecular mechanisms of consolidation and reconsolidation found these two processes to be similar^{11–13}. However, both quantitative and qualitative differences in the gene and cellular processes associated with both phenomena have since been identified^{14,15}. Moreover, functional pharmacological and gene knockdown studies have demonstrated that the consolidation and reconsolidation of a given memory are not dependent upon the same mechanisms^{16,17}, even in the brain areas involved in both processes^{3,18,19}.

With the discovery and acceptance of adult hippocampus neurogenesis (AHN), many studies carried out in the past decade have set out to establish the role of this phenomenon in learning and memory processes. In some such studies, neurogenesis was interrupted for long periods of time and conflicting

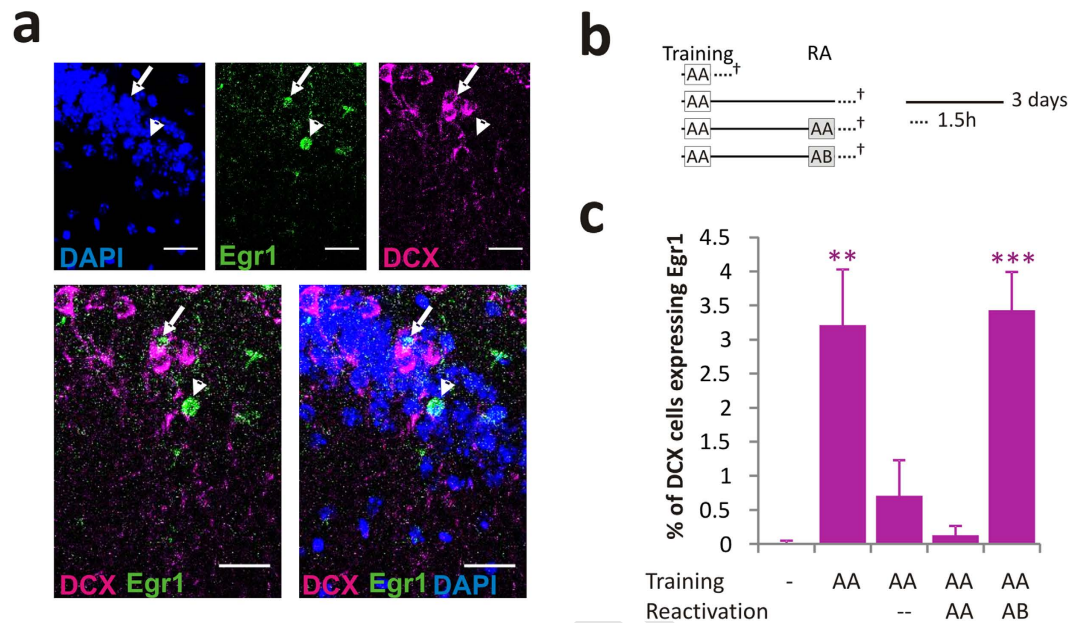


Figure 2. Stored memory retrieval with novelty recruits adult immature neurons to hippocampal circuits. (a) Representative microphotograph of immunofluorescence for Egr1 (green), doublecortin (purple) and DAPI (blue). Merged images of Egr1 and DCX, and of Egr1, DCX and DAPI are shown. The arrow and arrowhead indicate a DCX cell expressing Egr1 and granular neuron expressing Egr1, respectively. (b) Schematic representation of the experiment, where † represents the sacrificing of the mice. (c) Quantification of DCX cells expressing Egr1 in the different experimental groups: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$.

results were obtained⁷. Such discrepancies may be due to differences in the ablation protocol or the cognitive paradigms used, or even in the alterations to compensatory neuronal circuits that result from the long-term inhibition of neurogenesis. However, all these studies focus more on adult generated mature neurons that on the different stages of the neurogenic process. In the past few years, manipulating neurogenesis over short periods of time has become a possibility^{8,20}. We have developed an X-Ray irradiation protocol⁸ that rapidly depletes the hippocampus of actively dividing neurogenic cells and around 90% of the DCX expressing cells, probably because these latter cells retain their capacity to divide albeit at a very low rate. In fact, DCX is expressed in hippocampal cells over a wide range of stages, from transiently amplifying progenitor cells to early post-mitotic cells^{21,22}. Thus, the 10% of DCX expressing cells that survived irradiation might represent the more mature DCX expressing cells that can be distinguished from the rest of this population because they also express calretinin, a marker of immature post-mitotic cells during adult neurogenesis²³. Using this fast X-Ray depletion of adult immature cells, we found that neurogenesis is required for the acquisition and formation of long-term memory in object recognition and passive avoidance tests⁸. By contrast, selective inactivation of 4-week-old immature neurons by optogenetic techniques only provoked consolidation impairment in fear condition tests²⁰. The differences between the results obtained may reflect the different periods of immature neuron ablation/inactivation.

Although neurogenesis is required for long-term memory formation, the possible role of immature cells in the reconsolidation process is unknown. The function of reconsolidation is to stabilize and reinforce a retrieved memory^{24,25} and/or to incorporate new information into the original stored memory trace^{26,27} depending on how the reactivation (RA) session is performed (with or without novelty). Here, and using an object recognition (OR) memory test, we demonstrate that AHN is required only when the reactivation session involves novelty and this process drives the updating of stored OR memories. Interestingly, the temporal requirement, three days, of neurogenesis after reactivation for reconsolidation is the same as that found for consolidation⁸. These temporal requirements suggest that the new born cell activated after training or after reactivation with novelty sessions mature into neurons in this period, and for this reason irradiation at this time does not affect memory. Interestingly, Egr1 is a transcription factor that is more strongly expressed in DCX positive cells under both circumstances, and it seems to be related with the activity-dependent selection and maturation of adult new born hippocampal cells²⁸. Thus, these results indicate that both long-term OR memory formation and the updating of the stored object recognition memory have the same temporal requirement for neurogenesis.

Adult newborn granule cells generated from dividing dentate gyrus progenitors evolve through several stages to become mature granule cells that are indistinguishable from the granule cells born during embryonic development^{29–31}. Indeed, these adult-generated neurons are known to be active in

the formation and/or expression of memory^{32–34}, indicating that they can integrate into functional hippocampal networks. However, whether the immature neurons generated in the adult hippocampus start to integrate into neuronal circuits before they mature completely is not known. We used *Egr1* expression, a marker of neuronal activity and circuit integration⁹, combined with DCX, an immature neuron marker, to demonstrate that the activity of immature neurons changes after OR training and after RA with novelty. These results suggest that immature hippocampal DCX⁺ neurons may direct novel object recognition.

Taken together, our behavioural and histological results demonstrate that AHN is needed for reconsolidation processes only when it drives the updating of object recognition stored memories. If it were possible to deplete or interfere with this type of neurogenesis without producing any adverse cognitive effects, such an approach may be therapeutically useful to deal with certain conditions, such as post-traumatic stress disorder³⁵.

Materials and Methods

Animals. The male Swiss (CD1) mice used in this study (5–6 weeks-old) were purchased from an authorized provider (University of Seville, Spain, or Janvier, France) and they were habituated to standard animals housing conditions for 2–3 weeks (a 12h light/dark cycle, temperature and humidity). Behavioural studies were performed when the mice reached 8 weeks-of-age. All experiments were performed in accordance with European Union guidelines (2010/63/EU) and with Spanish regulations for the use of laboratory animals in chronic experiments (RD 53/2013 on the care of experimental animals: BOE 08/02/2013), and the approval of the University Pablo de Olavide animal care committees was obtained prior to performing this study.

X-ray irradiation. The mice were immobilized in a plastic cylinder and positioned in the X-ray irradiation apparatus (MBR-1505R, HITACHI) as described elsewhere⁸. Animals were irradiated at 150 kV and 5 mA with a lead shield covering their entire body, except for the head. Radiation was administered for about 30 min at an approximate dose of 0.35 Gy/min and at a source-to-skin distance of 13 cm, delivering a total of 10 Gy. The slow rate at which irradiation is administered is probably responsible for allowing us to destroy the main part of the immature hippocampal cells by a mechanism that is not fully defined. Notably, this protocol did not affect the locomotion of the mice. Control animals were littermates handled similarly but not irradiated.

Cannulation and Drug infusion. Mice were anesthetized with 4% chloral hydrate (10 μ L/kg of body weight, i.p.) and when fully anesthetized, they were situated in a stereotactic frame. In order to inactivate the majority of the hippocampus, two pairs of stainless-steel guide cannulae were implanted bilaterally into the dorsal and ventral hippocampus of the mice at the following stereotactic coordinates: Dorsal, AP = −2.0 mm, ML = \pm 1.4 mm, V = −1.3 mm; and Ventral, AP = −3.2 mm, L = \pm 2.8 mm, V = −3.25 mm from the Bregma. The mice were then allowed to recover for at least 7 days. To transiently inactivate hippocampal activity, an inhibitory cocktail was prepared in PBS that contained tetrodotoxin (TTX [Tocris]: a sodium channel blocker, 20 μ M) and 6-cyano-7-nitroquinoxaline (CNQX [Tocris]: a selective antagonist of AMPA receptors, 3 mM). The mice received infusions (0.5 μ l) of the TTX-CNQX cocktail or PBS alone 30 minutes prior to the memory test, delivered through each cannula at a rate of 0.2 μ l/min. The injection syringe (Hamilton) was left in place for 1 min following infusion.

Object recognition (OR) memory. Mice were tested in a rectangular arena (55 \times 40 \times 40 cm) located in a room with dim lighting and constant background noise. The plastic objects used were of different shapes, colours and textures, and they were thoroughly cleansed with 70% ethanol between trials to ensure the absence of olfactory cues. The mice did not show any preference for any of the selected objects. The OR memory tests were performed as described in³. Briefly, two identical objects were placed in a rectangular arena during the training phase of the object recognition protocol. Subsequently, the animal's memory of one of the original objects was assessed by comparing the amount of time spent exploring the novel object compared with that spent exploring the familiar one. The time spent exploring each object was recorded and the relative exploration of the novel object was expressed as a discrimination index [DI = ($t_{\text{novel}} - t_{\text{familiar}}$) / ($t_{\text{novel}} + t_{\text{familiar}}$)]. The criteria for exploration were based strictly on active exploration, circling or sitting on the object were not considered exploratory behaviours. Importantly, the exploration times in each session of the OR test were no different for the irradiated and sham mice (Table S1). All trials were performed by an experimenter blind to the drug treatments and/or manipulations, and each experimental group contained at least 7 mice.

Experiment 1. The effect of depleting neurogenesis on OR memory reconsolidation was assessed three days after the end of the training session in a 10 minute reactivation session performed in a rectangular arena. Irradiation was administered after the end of a reactivation session, in which the mice were exposed to: 1, reactivation without novelty (with the same object used during training session); or 2, reactivation with novelty (with a familiar object used in training session and a novel object); or no object reactivation in the home cage or in the arena. Three days after this reactivation session finished, one

object was changed for a novel one in order to test neurogenesis dependent post-reactivation long-term memory (PR-LTM).

Experiment 2. To assess the temporal relationship between adult hippocampal neurogenesis and OR reconsolidation, mice were irradiated 24, 48 or 72 h after a reactivation session with novelty had terminated. PR-LTM was evaluated 3 days after reactivation with the object shown in Fig. 1e.

Experiment 3. Hippocampal dependency of OR memory recall 3 days after reactivation. To evaluate the hippocampal dependency of our reconsolidation protocol, the hippocampus was inactivated by administering a TTX-CNQX cocktail 30 minutes before PR-LTM.

Immunofluorescence and histological analysis. The brain of the mice was fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in saline for 24 h at 4°C. The tissue was cryoprotected in 30% sucrose-saline for 2 days at 4°C, and then embedded in 30% sucrose and maintained at 4°C. Immunofluorescence was performed on coronal brain sections (50 µm) essentially as described previously³⁶. The sections were permeabilized with 1% Triton X-100 in PBS for 1 h, blocked in 5% (w/v) BSA, 1% Triton X-100 in PBS for 1 h, and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies of interest (see below) diluted in 1% (w/v) BSA, 1% Triton X-100 in PBS. The following day, the sections were rinsed for 1 h in PBS containing 0.1% Triton X-100, incubated for 1 h with the corresponding secondary antibodies diluted in 1% (w/v) BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS, and after rinsing again with 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 h and with PBS alone for 10 min, the sections were finally mounted in 50% glycerol. Primary antibodies against doublecortin (DCX, 1:100, Santa Cruz) and Egr1 (1:100 Santa Cruz) were used to visualize immature neurons and active cells, respectively. Primary antibody binding was visualized with an Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit antibody or an Alexa Fluor 647-conjugated anti-goat antibody (1:500, Invitrogen) for Egr1 and DCX, respectively. The sections were counterstained with DAPI (1:5000) to visualise the cell nuclei. To minimize variability, at least 2 sections from the rostral (from −1.58 to −2.06 mm respect to Bregma) hippocampus were analysed per animal (n = 4 mice per experimental group) on a fluorescence confocal SPE DM 2500 microscope (Leica). In each section, the total number of labelled cells in the dentate gyrus area was quantified using Image-J software (downloaded as a free software package from the public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

Statistical analysis. The results were analyzed with the SPSS package for Windows and unless otherwise stated, the data represent the mean ± SEM values. The data were analyzed with one-way and two-way ANOVA, and a t-test was used for post-hoc comparisons.

References

1. Dudai, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* **55**, 51–86 (2004).
2. McGaugh, J. L. Memory—a century of consolidation. *Science* **287**, 248–251 (2000).
3. Romero-Granados, R., Fontán-Lozano, A., Delgado-García, J. M. & Carrión, A. M. From learning to forgetting: behavioral, circuitry, and molecular properties define the different functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus* **20**, 584–59. (2010).
4. Misanin, J. R., Miller, R. R. & Lewis, D. J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* **160**, 554–555 (1968).
5. Nader, K. Memory traces unbound. *Trends Neurosci.* **26**, 65–72 (2003).
6. Lee, J. L. C., Everitt, B. J. & Thomas, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* **304**, 839–843 (2004).
7. Marín-Burgin, A. & Schinder, A. F. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav. Brain Res.* **227**, 391–399 (2012).
8. Suárez-Pereira, I., Canals, S. & Carrión, A. M. Adult newborn neurons are involved in learning acquisition and long-term memory formation: The distinct demands on temporal neurogenesis of different cognitive tasks. *Hippocampus* **25**, 51–61 (2015).
9. Guzowski, J. F. *et al.* Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 599–606 (2005).
10. Bozon, B., Davis, S. & Laroche, S. A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* **40**, 695–701 (2003).
11. Dudai, Y. & Eisenberg, M. Rites of passage of the engram: Reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* **44**, 93–100 (2004).
12. Alberini, C. M. Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci.* **28**, 51–56 (2005).
13. Tronson, N. C. & Taylor, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 262–275 (2007).
14. von Hertzen, L. S. & Giese, K. P. Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J. Neurosci.* **25**, 1935–1942 (2005).
15. Barnes, P., Kirtley, A. & Thomas, K. L. Quantitatively and qualitatively different cellular processes are engaged in CA1 during the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. *Hippocampus* **22**, 149–171 (2012).
16. Debiec, J. & LeDoux, J. E. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience* **129**, 267–272 (2004).
17. Lee, J. L. C., Robert, E. & Hynds, R. E. Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* **23**, 233–244 (2013).
18. Taubenfeld, S. M., Milekic, M. H., Monti, B. & Alberini, C. M. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP beta. *Nat. Neurosci.* **4**, 813–818 (2001).
19. Milekic, M. H., Pollonini, G. & Alberini, C. M. Temporal requirement of C/EBPbeta in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance. *Learn Mem* **14**, 504–511 (2007).

20. Gu, Y. *et al.* Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat. Neurosci.* **15**, 1700–1706 (2012).
21. Kronenberg, G. *et al.* Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J. Comp. Neurol.* **467**, 455–463 (2003).
22. Brown, J. P. *et al.* Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* **467**, 1–10 (2003).
23. Brandt, M. D. *et al.* Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol. Cell. Neurosci.* **24**, 603–613 (2003).
24. Przybylski, J. & Sara, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav. Brain Res.* **84**, 241–246 (1997).
25. Lee, J. L. C. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat. Neurosci.* **11**, 1264–1266 (2008).
26. Lee, J. L. C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci.* **32**, 413–420 (2009).
27. Lee, J. L. C. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front. Behav. Neurosci.* **4**, 168 (2010).
28. Veyrac, A. *et al.* Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 7062–7067 (2013).
29. Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. & Kronenberg, G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* **27**, 447–452 (2004).
30. Laplagne, D. A. *et al.* Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol.* **4**, e409 (2006).
31. Suh, H. K. *et al.* *In vivo* fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* **1**, 515–528 (2007).
32. Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H. & Frankland, P. W. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* **10**, 355–362 (2007).
33. Trouche, S., Bontempi, B., Roullet, P. & Rampon, C. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 5919–5924 (2009).
34. Stone, S. S. D. *et al.* Functional convergence of developmentally- and adult-generated granule cell in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus* **21**, 1348–1362 (2011).
35. Schwabe, L., Nader, K. & Pruessner, J. C. Reconsolidation of Human Memory: Brain Mechanisms and Clinical Relevance. *Biol. Psychiatry* **76**, 274–280 (2014).
36. Ruiz, R. *et al.* Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J. Neurosci.* **31**, 2000–2008 (2011).

Acknowledgments

We thank Mrs Tatyana Rybkina for her assistance with the animal handling and maintenance, the animal facilities at the Centro de Biología del Desarrollo (CABD) for help with the X-irradiation and Dr M. Sefton for editorial assistance. This work was supported by grants from the Fundación Ramón Areces, the DGICYT (Departamento Governamental de Investigaciones Científicas y Tecnológicas: BFU2011-27207) and the Junta de Andalucía (CTS-2257). IS-P was supported by a University Pablo de Olavide fellowship.

Author Contributions

I.S.-P. carried out all the behavioural, immunohistochemical and imaging analyses. A.M.C. supervised the project. I.S.-P. and A.M.C. wrote the manuscript. All of the authors read and discussed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Suárez-Pereira, I. and Carrión, Á M. Updating stored memory requires adult hippocampal neurogenesis. *Sci. Rep.* **5**, 13993; doi: 10.1038/srep13993 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Updating stored memory requires adult hippocampal neurogenesis

Irene Suárez-Pereira and Ángel M Carrión *

¹Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Carretera de Utrera Km 1, 41013 Sevilla, Spain.

Inventory of Supplemental Information

Supplemental Figures. All Supplemental figures are related with Figure 1, and they show that our X-ray irradiation protocol does not affect to: mature neuron of dentate gyrus, and inflammatory processes.

Figure S1: X-ray irradiation impairs neurogenesis for at least 3 days. We show that irradiation protocol provoke a transient neurogenesis depletion without affect to mature neurons of dentate gyrus.

Figure S2: X-ray irradiation doesn't provoke a significant inflammatory response in the hippocampus.

Figure S3: Effect of the depletion of adult neurogenesis provoked by X-ray irradiation on object recognition memory reconsolidation when object recognition memory reactivation was performed in a novel context.

Supplemental tables.

Table S1 Object exploration time (seconds) per session in the ORM experiments. This table demonstrates that X-ray irradiation does not affect to mice exploratory activity. This table is related with Figure 1.

Table S2 Primer sequences used for RT-PCR gene expression analysis.

Supplemental Experimental Procedures

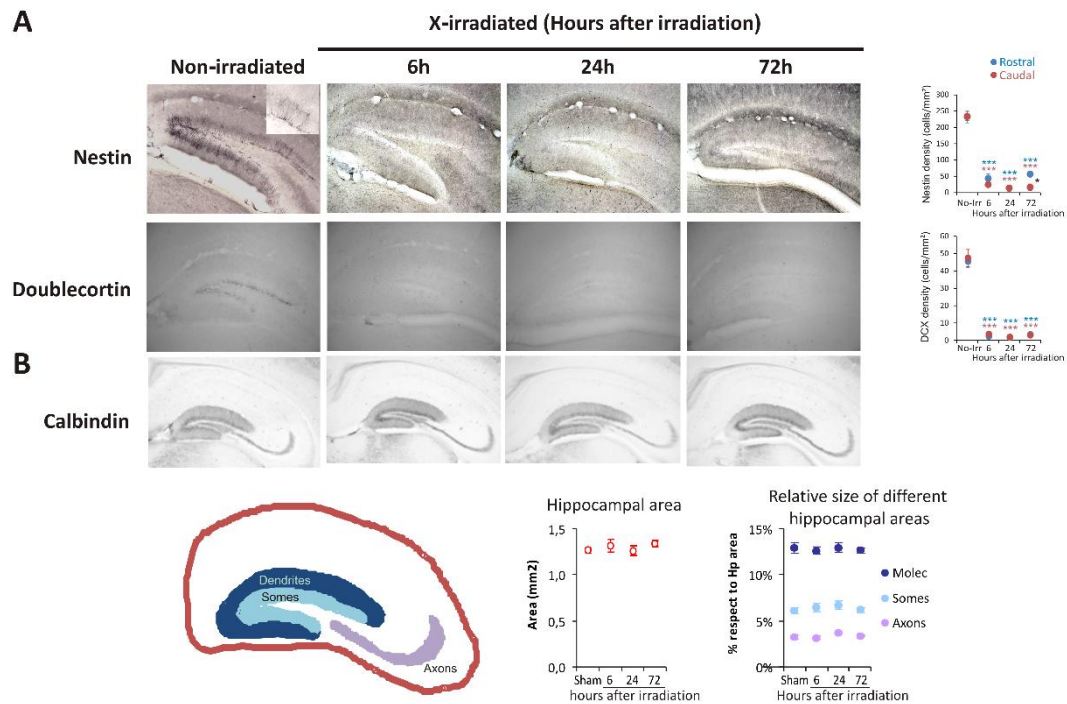
Immunohistochemistry, immunofluorescence and histological analysis showed in Supplementary figures S1 y S2.

RT-PCR gene expression. We perform a detailed description of gene expression experiments presented in Figure S2 of supplemental material.

Object recognition reconsolidation when reactivation and training sessions were performed in different contexts.

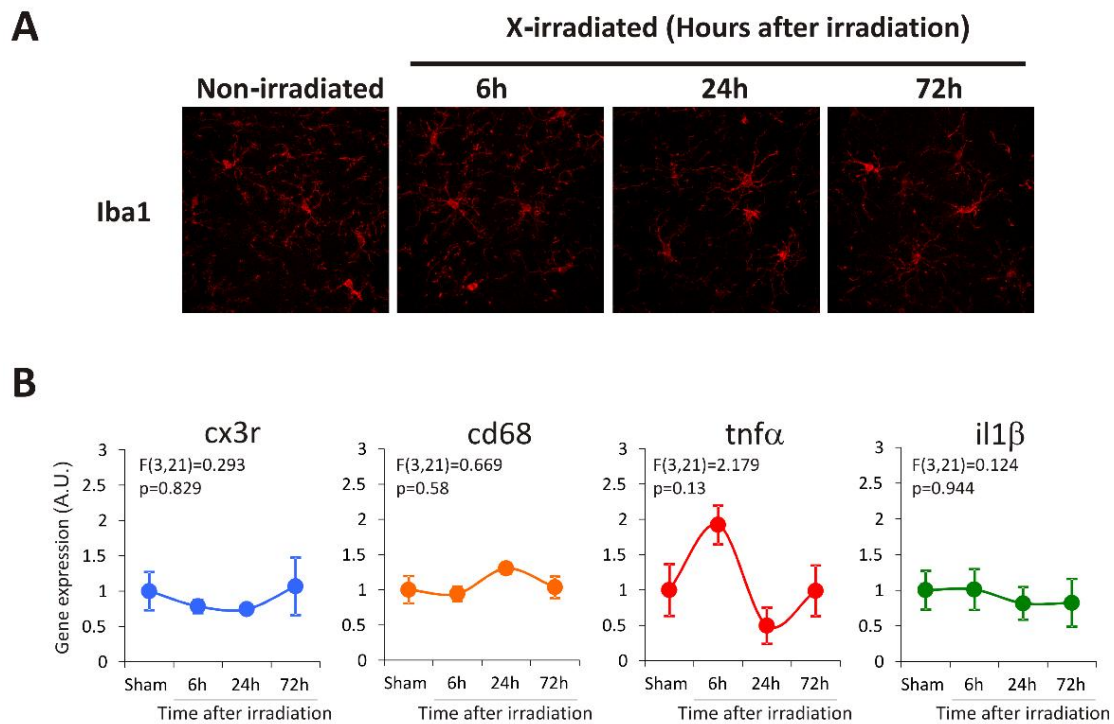
Supplemental Figures

Figure S1.



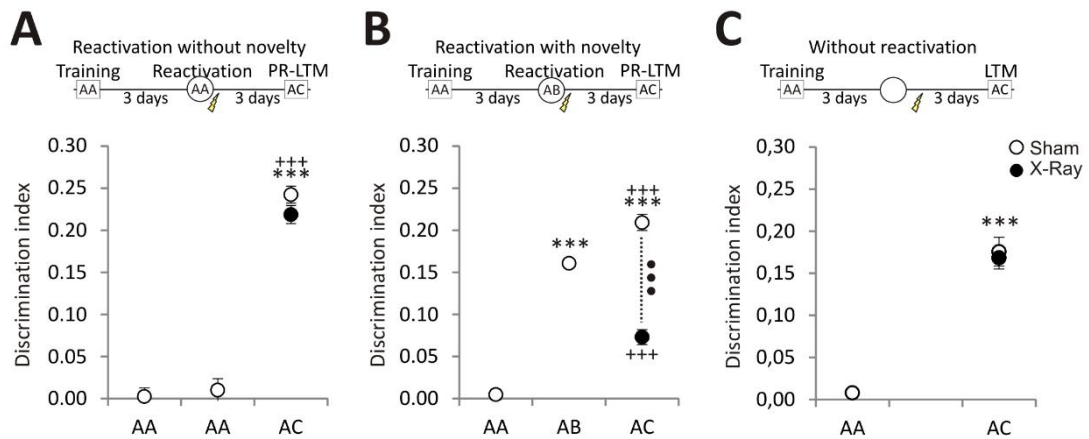
Supplemental Figure 1. X-ray irradiation impairs neurogenesis for at least 3 days. A, Representative microphotographs of immunohistochemistry for neural precursors (nestin), immature neurons (doublecortin, DCX) and mature neurons (calbindin) markers in the hippocampus of mice sacrificed 6, 24, and 72 hours after irradiation and in non-irradiated mice (sham). Around 85% of nestin cells and more than 90% DCX cells were lost in the first three days after irradiation. The inset in some microphotographs shows nestin positive cells at a higher magnification. The density of nestin and DCX expressing cells in the rostral (red plot) and caudal (blue plot) dentate gyrus of the hippocampus in mice sacrificed 6, 24, and 72 hours after irradiation, and in sham irradiated mice. **B,** Quantification of hippocampal surface and the relative area of the different part (dark blue, dendrites; light blue, somes; and lilac, axons) of calbindin positive neurons (granular cells) population in hippocampus of mice sacrificed 6, 24, and 72 hours after irradiation and in sham mice. No alterations in any of the parameter were detected. C, PCNA gene expression in the hippocampus of mice sacrificed 6, 24, and 72 hours after irradiation and in sham irradiated mice. A transient loss of PCNA is observed during the first 72 hours. $n > 5$ mice per group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$.

Figure S2.



Supplemental Figure 2. X-ray irradiation does not provoke significant inflammatory response in the hippocampus. **A**, Representative immunofluorescence microphotographs for the microglial marker Iba1 in the hippocampus of mice sacrificed 6, 24 and 72 hours after irradiation, and in non-irradiated (sham) mice. The number and morphology of microglial cells did not change after X-ray irradiation. **B**, Gene expression analysis of microglial marker activation (cd68, cx3cr, tnfa, and il1 β) in the hippocampus of mice sacrificed 6, 24 and 72 hours after irradiation, and in sham mice. Only a non-significant weak and transient increase in tnfa gene expression is observed. $n>5$ mice for sham groups and 4-5 mice for each of the irradiated groups.

Figure S3



Supplemental Figure 3. Effect of adult neurogenesis depletion on object recognition memory reconsolidation when reactivation is performed in a novel context. Reconsolidation in sham and irradiated mice was compared in three different circumstances: **A**, reactivation without novelty; **B**, reactivation with novelty; and **C**, no reactivation. In all cases, irradiation was performed 3 days after OR training and after reactivation in a context different (circle) to that used in the training session (rectangle). In each graph, the letters A, B and C represent the different objects used: * represent significant differences between the sessions and with the training session in the same experimental group; + represent significant differences between the LTM sessions and the reactivation session in the same experimental group; and • represent significant differences between the LTM session of each irradiated group with respect to the sham mice (one symbol, $p < 0.05$, two symbols, $p < 0.01$ and three symbols, $p < 0.001$).

Supplemental tables.

Table S1. Object exploration time (seconds) per session in the ORM experiments.

	Sessions				
Experiment	Training	Reactivation (RA)	LTM (A/C exploration times)	n	
Figure 1. Sensibility of reactivation to adult immature neuron depletion					
b. Reactivation without novelty					
Sham	118±4.08	61.2±8.52	82.4±4.73 (29±1.81/53.4±3.98)	8	
X-Ray 4h after RA session	115.2±7.73	64±6.14	72.2±3.21 (27.2±1.98/45±1.51)	7	
c. Reactivation with novelty					
Sham	112.54±5.23	70.63±4.94	64.36±4.53 (22.87±1.7/41.54±2.9)	10	
X-Ray 4h after RA session	117.4±9.41	68±5.68	61.28±3.99 (27±1.63/34.28±2.43)	8	
d. Without reactivation session					
Sham	106.83±7.59	--	56.16±5.23 (23±2.3/33.16±3)	12	
X-Ray 3 days after RA session	128.85±7.75	--	54.2±7.59 (20.85±2.45/31.42±3.22)	7	
Sham arena exploration session	129.33±4.01	--	50.16±3.17 (20±1.43/30.16±1.85)	6	
X-Ray 4h after arena exploration session	125.5±4.25	--	40.33±2.07 (16±0.57/24.53±1.52)	6	
Figure 1e. Adult immature neuron temporal requirement for post-reactivation LTM formation					
Objects	AA	AB	AC	BC	n
Sham	106±11.71	64.6±3.4	56.2±3.68 (19.8±1.39/36.4±2.71)	64±5.24 (25±3.53/39±2.23)	10
X-Ray 24h after RA	112±3.56	76±2.3	61.83±4.57 (26.83±1.81/35±2.82)	81.8±6.56 (41±3.06/40.8±3.77)	8
X-Ray 48h after RA	115.09±3.25	70.45±3.69	57.5±2.73 (24.66±2.15/32.83±1.62)	77.8±6.39 (37±2.7/40.8±3.87)	8
X-Ray 72h after RA	109.6±4.38	70.9±3.87	59.8±4.85 (21.4±1.63/36.4±2.71)	67±8.05 (26.8±3.26/40.2±4.82)	8
Figure 1f. Hippocampal-dependent reconsolidation 72h after reactivation					
Groups	Training	Reactivation (RA)	LTM (A/C exploration times)	n	
Sham RA without	114±5.77	67.66±5.33	85±6.92 (32±1.73/53±5.19)	7	

(w/o) novelty				
TTX/CNQX RA w/o novelty	112.4±5.12	62.6±5.71	69.4±4.1 (34±2.34/35.4±1.88)	7
Sham RA with (w) novelty (AC)	116.33±11.02	89±14.73	69±11.71 (25.66±3.52/43.33±8.51)	7
TTX/CNQX RA w novelty (AC)	111.8±5.56	92.4±9.22	89.6±6.2 (43.4±2.61/46.2±3.72)	7
Sham RA with novelty (BC)	128±9.23	96±13.79	102±9.64 (41.33±4.48/60.66±5.2)	7
TTX/CNQX RA w novelty (BC)	118.8±12.21	100±4.43	98.2±6.91 (50.8±4.35/47.4±2.61)	7

Table S2. Primer sequences used for RT-PCR gene expression analysis

gapdh-F	5'- GTAGGCCAAGTTGCCTTGTCCGT -3'
gapdh-R	5'- ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG -3'
cd68-F	5'- GGGGCTCTTGGGAACCTACAC-3'
cd68-R	5'- GTACCGTCACAACCTCCCTG-3'
cx3cr-F	5'- GCCTCTGGTGGAGTCTGCGTG-3'
cx3cr-R	5'- TGGGCTTCCGGCTGTTGGTG-3'
tnf α -F	5'- GGCAGGTCTACTTTGGGAGTCATTGC-3'
tnf α -R	5'- ACATTGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3'
il1 β -F	5'- AAAAGCCTCGTGCTGTCGGAC-3'
il1 β -R	5'- GCAGGGTGGGTGTGCCGTCT-3'

Supplemental Experimental Procedures

Immunohistochemistry, immunofluorescence and histological analysis

For immunohistochemistry (IHC), antibodies against calbindin (1:3,000, Swant), nestin (1:250, Genetex) and doublecortin (dcx, 1:500, Santa Cruz) were used. For immunofluorescence (IF), an antibody against Iba1 (1:500, Wako) was used. Antibody staining for IHC was visualized with H₂O₂ and diaminobenzidine, and for IF with an Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1:500, Invitrogen). To minimize variability, at least 2 sections from the rostral (from -1.58 to -2.06mm respect to Bregma) and caudal (from -2.92 to -3.50mm to Bregma) hippocampus were analyzed per animal under a bright-field DMRB RFY HC microscope (Leica) for IHC or a fluorescence confocal SPE DM 2500 microscope (Leica) for IF. In each section, the total number of positive cells and the dentate gyrus area was quantified using Image-J software (downloaded as a free software package from the public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

Reverse transcription-PCR analysis of mRNA

Total RNA was extracted using the Tripure reagent (Roche Products) from the brain tissue of at least of six animals per group, collected from at least two different experimental sessions. More detailed information on the primers used can be found in Table S2. The values obtained were normalized with respect glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression and they are expressed relative to those of the non-irradiated animals to which a value of 1 was assigned.

Object recognition reconsolidation when reactivation and training sessions were performed in different contexts

The effect of depleted neurogenesis on OR memory reconsolidation was assessed using a 10 minute reactivation session performed in a circular arena (new context) three days after the end of the training session performed in a rectangular arena. Irradiation was administered 4h after the end of a reactivation session, in which the mice were exposed to: 1, reactivation without novelty (the same object as that used during the training session); or 2, reactivation with novelty (with a familiar object used in the training session and then a novel object); or no object reactivation in the circular arena. Three days after this reactivation session finished, one object in the

rectangular arena was changed for a novel one in order to test neurogenesis dependent post-reactivation of long-term memory (PR-LTM).